

Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie
Prof. Dr. med. Ernst Tamm
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Programmierter Zelltod in der Retina von α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und α -Cre;Smad7^{fl/fl} Mäusen während ihrer Embryonalentwicklung



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde (Dr. med. dent.)

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Cora Demmer

2013

Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie
Prof. Dr. med. Ernst Tamm
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Programmierter Zelltod in der Retina von α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und α -Cre;Smad7^{fl/fl} Mäusen während ihrer Embryonalentwicklung



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde (Dr. med. dent.)

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Cora Demmer

2013

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ernst R. Tamm und betreut von Dr. Barbara M. Braunger.

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Gutachter:	Prof. Dr. Ernst R. Tamm
2. Gutachter:	Prof. Dr. Herbert Jägle
Tag der mündlichen Prüfung:	16.05.2013

I.	EINLEITUNG	1
I.1.	ANATOMIE DES AUGES	1
I.1.1.	Äußere Augenhaut (<i>Tunica fibrosa bulbi</i>)	2
I.1.2.	Mittlere Augenhaut (<i>Tunica vasculosa bulbi</i> , Uvea).....	2
I.1.3.	Innere Augenhaut (<i>Tunica interna bulbi</i> , Retina)	3
I.1.4.	Glaskörper (<i>Corpus vitreum</i>) und Linse.....	5
I.1.5.	Vordere und hintere Augenkammer (<i>Camera anterior und posterior bulbi</i>)	5
I.1.6.	Die Sehbahn.....	6
I.2.	PHYSIOLOGIE DES SEHENS	7
I.3.	RETINOPATHIEN	8
I.3.1.	Netzhautablösung.....	8
I.3.2.	Makuladegeneration	8
I.3.3.	Retinopathia pigmentosa	9
I.4.	EMBRYONALE ENTWICKLUNG DES AUGES	10
I.4.1.	Entstehung der Strukturen des <i>Bulbus oculi</i>	10
I.4.2.	Beteiligte Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle	14
I.5.	DER TGF- β SIGNALWEG	15
I.6.	DER PROGRAMMIERTE ZELLTOD	18
I.7.	DAS CRE/LOXP REKOMBINATIONSSYSTEM	21
I.8.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
I.8.1.	α -Cre; <i>TGF-β-R2^{fl/fl}</i> Mäuse	22
I.8.2.	α -Cre; <i>Smad7^{fl/fl}</i> Mäuse.....	23
II.	MATERIAL UND METHODEN	24
II.1.	MATERIALLISTE	24
II.1.1.	Reagenzienliste	24
II.1.2.	Enzyme und Kits.....	24
II.1.2.1.	Enzyme	24
II.1.2.2.	Kits	25
II.1.3.	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	25
II.1.3.1.	Verbrauchsmaterialien	25

II.1.3.2. Geräte	26
II.1.4. Gele, Puffer und Lösungen.....	26
II.1.4.1. Agarosegel	26
II.1.4.2. Puffer und Lösungen	27
II.1.5. Antikörper	28
II.1.6. Oligonukleotidprimer für Genotypisierungs-PCRs	29
II.2. VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG	29
II.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	30
II.3.1. Isolierung von DNA aus Mausschwanzbiopsien und embryonalem Gewebe	30
II.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
II.3.3. Genotypisierung der Versuchstiere	31
II.3.3.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	31
II.3.3.2. Cre-Rekombinase	31
II.3.3.3. TGF- β -R2.....	32
II.3.3.4. Smad7	33
II.3.3.5. Agarose-Gelelektrophorese.....	34
II.4. HISTOLOGISCHE TECHNIKEN.....	35
II.4.1. Einbettung, Gewebeschnitte und Phänotypanalyse	35
II.4.1.1. Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinschnitten	35
II.4.1.2. Eponeinbettung, Anfertigung von Semidünnschnitten und Phänotypanalyse	36
II.4.2. Immunhistologische Methoden.....	38
II.4.2.1. TUNEL-Reaktion	38
II.4.2.2. BrdU-Färbung.....	39
II.4.3. Eindeckeln von Gewebeschnitten.....	40
II.5. AUSWERTUNG UND STATISTIK.....	41
III. ERGEBNISSE.....	42
III.1. KONDITIONELLER KNOCKOUT DES TGF- β -REZEPTORS2.....	42
III.1.1. Nachweis des konditionellen Knockouts von TGF- β -R2 durch Western Blot Analyse	42

III.1.2. Phänotypanalyse der α -Cre;TGF- β -R2 ^{fl/fl} Mäuse	43
III.1.2.1. Morphologie.....	43
III.1.2.2. Dickenmessung der Retina	45
III.1.2.3. Zellzählung der Retina	46
III.1.3. Detektion apoptotischer Zellen mittels der TUNEL-Reaktion	47
III.1.4. Bestimmung der Zellproliferationsrate mittels BrdU-Färbung	49
III.2. KONDITIONELLER KNOCKOUT VON SMAD 7	51
III.2.1. Nachweis des konditionellen Knockouts von Smad 7 durch Western Blot Analyse	51
III.2.2. Phänotypanalyse der α -Cre;Smad7 ^{fl/fl} Mäuse	52
III.2.3. Detektion apoptotischer Zellen mittels der TUNEL-Reaktion	53
IV. DISKUSSION	55
IV.1. KONDITIONELLER KNOCKOUT DES TGF- β -REZEPTORS2	55
IV.2. KONDITIONELLER KNOCKOUT VON SMAD 7	58
IV.3. ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN UND AUSBLICK	59
V. ZUSAMMENFASSUNG	61
VI. ANHANG	62
VI.1. LITERATURVERZEICHNIS	62
VI.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	69
VI.3. TABELLENVERZEICHNIS	70
VI.4. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	71
VI.5. SYMBOLVERZEICHNIS	75
VI.6. DANKSAGUNG	76
VI.7. LEBENSLAUF	77
VI.8. ERKLÄRUNG	78

I. Einleitung

„Mit der Sinneswahrnehmung beginnt alle Erkenntnis, wenn auch das Wesen der Dinge nur dem Denken sich enthüllt.“ (1)

Schon der Philosoph Aristoteles erkannte die Bedeutung der Sinne für den Menschen. Neben olfaktorischen, auditorischen, gustatorischen und sensiblen Eindrücken nimmt die visuelle Wahrnehmung der Außenwelt eine zentrale Position in unserem Leben ein.

Zu Beginn soll die Anatomie des visuellen Sinnesorgans, des Auges, das Gegenstand dieser Arbeit ist, dargestellt werden.

I.1. Anatomie des Auges

Das Auge besteht aus dem Bulbus oculi und Hilfs- bzw. Schutzorganen, wie der Konjunktiva und dem Augenlid.

Im Inneren des Bulbus oculi findet man den Corpus vitreum mit der am vorderen Rand gelegenen Linse. Die Wand des Bulbus oculi kann man schichtweise unterteilen in eine äußere, mittlere und innere Augenhaut. (2) (s. Abb. 1)

Tunica	zugehörige Strukturen
fibrosa bulbi (äußere Augenhaut)	- Sklera - Kornea
vasculosa bulbi (mittlere Augenhaut, Uvea)	- Choroidea - Corpus ciliare - Iris
interna bulbi (innere Augenhaut)	- Retina

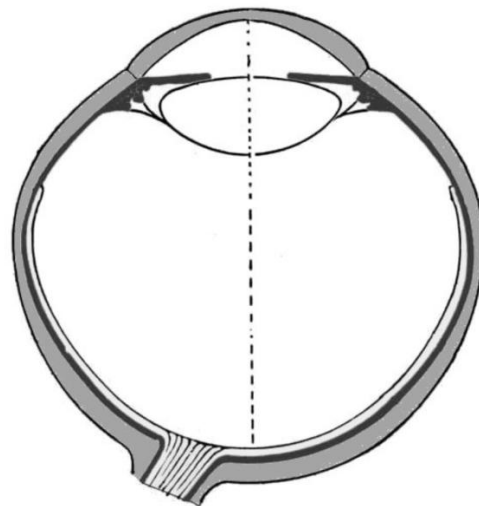


Abbildung 1: Übersicht über den dreischichtigen Wandaufbau des Auges, modifiziert aus (3)

I.1.1. Äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi)

Dicht zusammengelagerte Bündel von Kollagenfasern verschiedener Verlaufsrichtungen mit eingelagerten Pigmentzellen bilden die *Sklera*. Durch ihre feste Struktur leistet sie dem Augeninnendruck von 15-18 mmHg Widerstand und bietet einen Ansatzpunkt für die äußeren Augenmuskeln. Sie ist mit 0,8-1 mm Dicke (Ausnahme im Bereich der Papille bis 1,5 mm) etwas dünner als die nach anterior anschließende *Kornea*, die am Rand eine Dicke von 1,1 bis 1,2 mm aufweist. Die Kornea ist stärker gekrümmt als die Sklera und gehört ebenso wie die Linse zu den lichtbrechenden Elementen des optischen Systems. Sie trägt mit 43 dpt maßgeblich zur Gesamtbrechkraft von rund 59 dpt des Auges bei. (4–6) Die Kornea lässt sich in fünf Schichten unterteilen. Zwischen einem vorderen mehrschichtig unverhornten Kornealepithel mit Basallamina und anliegender zellfreier Grenzschicht (Bowman-Membran) und einem hinteren einschichtigen Kornealendothel mit Basallamina und dünnerer Grenzschicht (Descement-Membran) liegt ein Stroma aus zu 200 bis 250 Lamellen geschichteten Kollagenfibrillen (7), Proteoglykanen, Wasser, einzelnen elastischen Fasern, Fibrozyten und sensiblen Nervenfasern aus dem N. ophthalmicus. (2) Die oberflächlichen polygonalen, abgeflachten Zellen des vorderen Epithels werden als Superfizialzellen bezeichnet, die sich zyklisch abstoßen und durch Intermediärzellen der nächsttieferen Schicht ersetzt werden. (7) Die Ernährung der Kornea erfolgt über Diffusion aus dem Kammerwasser. (4)

I.1.2. Mittlere Augenhaut (Tunica vasculosa bulbi, Uvea)

Zwischen der Sklera und der Basallamina des Pigmentepithels der Retina liegt in der hinteren Augenhälfte die gefäßreiche *Choroidea*. Sie besteht von außen nach innen aus der Suprachoroidea (Haller-Schicht) mit Nerven und Gefäßen, einem breiten Stratum vasculare und der Choriocapillaris. Die dicht gepackten Kapillaren sind umgeben von lockerem Bindegewebe und vielen Melanozyten. (2)

Das *Corpus ciliare* liegt ringförmig in der vorderen Augenhälfte, es reicht von der Ora serrata bis zur Iriswurzel. Zum Einen besteht der Ziliarkörper als dem Ziliarmuskel, der am Sklerasporn (innerer Ausläufer der Sklera am Übergang zur Kornea) und der

Descement-Membran des hinteren Kornealendothels seinen Ursprung hat und an den elastischen Fasern der Bruch-Membran ansetzt, zum Anderen sind die Ziliarzotten essentieller Bestandteil des Corpus ciliare. Sie werden bedeckt von der Pars ciliaris retinae, einem zweischichtigen Zottenepithel der Retina, das keine Lichtsinneszellen enthält. An der Basallamina der inneren Epithelschicht inserieren an der Grenze zur hinteren Augenkammer die Zonulafasern, die aus Fibrinfibrillen bestehen und von dort zur Linsenkapsel ziehen. (2) Das Corpus ciliare dient der Akkommodation und Kammerwasserbildung. (7)

Die *Iris* ist eine weitere Struktur, die zur Mittleren Augenhaut zählt. Sie liegt, ebenfalls ringförmig, vor der Linse und dient dort als Blende; zentral bildet sie die Pupille. Nach außen besteht die Iris aus einem fibrozyten-, kollagenfaser- und blutgefäßhaltigen Stroma mit unterschiedlicher Anzahl eingelagerter Melanozyten, die für die Augenfarbe verantwortlich sind. Innen liegt ein zweilagiges Irisepithel, durch jeweils eine Basallamina zum Irisstroma und zur hinteren Augenkammer abgegrenzt, das ebenfalls pigmentiert und somit für die Lichtundurchlässigkeit der Iris verantwortlich ist. (4) Das Irisepithel entspricht dem am weitesten peripher gelegenen Anteil der Retina (Pars iridica retinae), der ebenso wie die Pars ciliaris retinae keine Lichtsinneszellen enthält. In der Iris befinden sich zudem vegetativ innervierte Muskelfasern, die am Pupillenrand den M. dilatator und sphincter pupillae bilden. (2)

I.1.3. Innere Augenhaut (Tunica interna bulbi, Retina)

Die Retina wird aus 2 Blättern gebildet, dem äußeren Stratum pigmenti und dem inneren Stratum nervosum, zwischen denen ein schmaler Spalt, der Sehventrikel, besteht. Man unterscheidet eine anteriore Pars caeca, die keine Lichtsinneszellen enthält, von einer Pars optica mit Lichtsinneszellen und Nervengewebe; sie gehen an der Ora serrata ineinander über. (2)

Das retinale Pigmentepithel (Stratum pigmenti) ist ein einschichtig kubisches Epithel. Seine hauptsächliche Aufgabe liegt im Abbau zugrunde gegangener Stäbchen und Zapfen und in der Regeneration des Sehpigments Rhodopsin im Zuge des Sehzyklus. (2,8)

Stratum pigmenti und nervosum bilden im Bereich der Pars optica gemeinsam die typische zehnfache Schichtung der Retina. (2) Als äußerste Schicht schließt sich an das retinale Pigmentepithel die Schicht der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren an. Es folgt die Membrana limitans externa (äußere Gliagrenzschicht), welche aus Zonulae adherentes bestehend keine eigentliche Membran darstellt und für den mechanischen Zusammenhalt zwischen Müller Gliazellen und Photorezeptorinnensegmenten sorgt (9), dann die äußere Körnerschicht mit den Perikaryen der Stäbchen und Zapfen, die äußere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht mit Kernen der Bipolaren Ganglienzellen, Amakrinen Zellen, Müllerzellen und Horizontalzellen und die innere plexiforme Schicht, dann die einschichtige Ganglienzellschicht, die Nervenfaserschicht und schließlich die Membrana limitans interna (innere Gliagrenzschicht). (7) (s. Abb. 2)

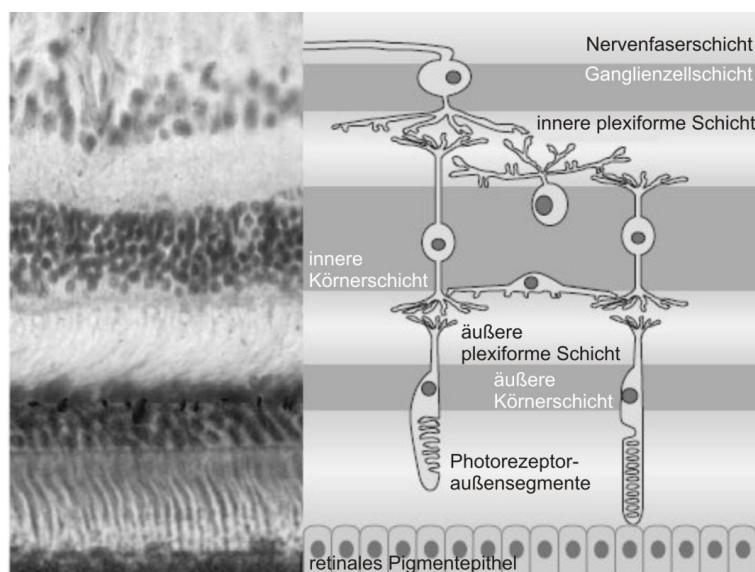


Abbildung 2: Schichtung der Retina, die innere und äußere Gliagrenzschicht sind nicht abgebildet, modifiziert aus (10)

Neben Sinnes- und Nervenzellen enthält die Retina die bereits genannten Müller-Gliazellen und zwei laterale Interneuronensysteme: die Amakrinen Zellen und Horizontalzellen, welche im Bereich der inneren beziehungsweise äußeren plexiformen Schicht Synapsen bilden und der Hemmung oder Rückkopplung der Signalweiterleitung dienen. (6) Im menschlichen Auge kommen ca. 6 Millionen Zapfen, 110 Millionen Stäbchen und 1 Millionen Ganglienzellen vor. Die Stäbchen

und Zapfen haben einen grundsätzlich identischen Aufbau aus einem, über ein Zilium verbundenen, Außen- und Innenglied; sie divergieren jedoch in ihrer biochemischen Wirkweise. Der Sehfärbstoff der Stäbchen ist das Rhodopsin, bestehend aus Opsin und 11-cis-Retinal, die Sehfärbstoffe der Zapfen sind drei verschiedene Zapfenopsine. (6)

I.1.4. Glaskörper (*Corpus vitreum*) und Linse

Der *Corpus vitreum* füllt den mittleren, größten Teil des Auges aus und besteht zu 98% aus Wasser und zu 2% aus Hyaluronsäure, einzelnen Fibrozyten, Makrophagen und Kollagenfibrillen. Er ist an der Innenseite der Retina befestigt, v.a. im Bereich der Ora serrata und der Papille des N. opticus. (2)

Die *Linse* liegt gekrümmt am Vorderrand des *Corpus vitreum* und ist umgeben von einer Kapsel, in der die Zonulafasern inserieren. Im vorderen, weniger stark gekrümmten Teil der Linse findet man ein einschichtiges kubisches Epithel, im hinteren und stärker gekrümmten Teil lagern sich die länglichen Zellen zu sogenannten Linsenfasern zusammen. Wesentlicher Bestandteil der Linsenfasern sind Kristalline, die für die Brechkraft der Linse verantwortlich sind. (2) Die Linse ist mit 19 dpt (6) das weniger stark lichtbrechende Element des Auges, im Gegensatz zur Kornea ist ihre Brechkraft aber variabel. Die Linse enthält weder Nerven noch Gefäße, sie wird über das Kammerwasser ernährt. (4)

I.1.5. Vordere und hintere Augenkammer (*Camera anterior* und *posterior bulbi*)

In der vorderen Augenhälfte finden sich zwischen den beschriebenen Strukturen zwei Räume, die mit Kammerwasser gefüllt und über die Pupille verbunden sind.

Die *Camera anterior* wird von der Kornearück- und der Irisvorderseite sowie seitlich von einem Randbezirk der Sklera eingefasst. (7) Im Winkel dieser beiden Strukturen liegt der Kammerwinkel mit dem aus Bindegewebe trabekeln bestehenden Trabekelwerk, das einen schwammartigen Aufbau zeigt und über flüssigkeitsgefüllte Spalten (Fontana-Räume) den Abfluss des Kammerwassers ermöglicht. 80% des

Kammerwassers fließen durch das Trabekelwerk in den Schlemm-Kanal, 20% nehmen den uvoskleralen Abfluss über das den Ziliarmuskel umgebende lockere Bindegewebe. (2) Der Augeninnendruck wird über das Verhältnis von Produktion und Abfluss des Kammerwassers reguliert und ist nötig zur Stabilisierung der Augenform sowie zur Aufrechterhaltung konstanter Abstände zwischen der Retina und den refraktiven Oberflächen der Kornea und Linse. (11)

Die Begrenzung der *Camera posterior* bildet die Rückseite der Iris und die vordere Begrenzung des Corpus vitreum im Bereich der Zonulafasern. (7)

I.1.6. Die Sehbahn

Optische Reize, die im Bereich der Retina aufgenommen werden, bedürfen der Weiterleitung, um im Gehirn schließlich zur Wahrnehmung verarbeitet zu werden, diese Aufgabe übernimmt die Sehbahn. Da die Retina bedingt durch ihre Embryonalentwicklung (s. I.4.1.) eine invertierte Struktur darstellt, muss das einfallende Licht zunächst alle weiter innen liegenden retinalen Schichten durchdringen, bevor es auf die Photorezeptoren trifft. Die Erregungsleitung geschieht dann in entgegengesetzter Richtung von der äußersten Schicht der Stäbchen und Zapfen zur innersten Ganglienzellschicht. Die ersten drei Projektionsneurone der Sehbahn liegen innerhalb des Stratum nervosum der Retina. (5) Die Photorezeptorzellen repräsentieren das erste, die bipolaren Zellen das zweite und die Ganglienzellen das dritte Neuron. Von dort aus schließen sich die Axone der Ganglienzellen zum Nervus opticus, dem II. Hirnnerven, zusammen und ziehen zu 90%, unter Kreuzung von Fasern der nasalen Netzhautbereiche im Chiasma opticum, zum vierten Neuron, das sich im Corpus geniculatum laterale befindet. Die Neurone des Corpus geniculatum laterale projizieren in die Area striata, welche sich im Occipitallappen der Großhirnrinde befindet und der bewussten Seh Wahrnehmung dient. (5) Die anderen 10% der Ganglienzellaxone enden im Colliculus superior, der Area preectalis, dem Nucleus suprachiasmaticus, den Nuclei terminales tractus optici, den Nuclei vestibulares, dem Pulvinar thalami und dem Nucleus parvocellularis; dort vermitteln sie die Verschaltung von Reflexen und die unbewusste Regulation mit dem Sehen assoziierter Vorgänge. (5)

I.2. Physiologie des Sehens

Den adäquaten Reiz für die Sinneszellen des Auges stellen elektromagnetische Strahlen mit Wellenlängen zwischen 400 und 750 nm dar. (6) Nach Durchtritt des dioptrischen Apparates des Auges wird auf der Retina ein umgekehrtes und verkleinertes Bild der Umwelt abgebildet. (6)

Beim Auftreffen eines Lichtquants auf die Netzhaut wird dieses bei den Stäbchen durch die chromophore Gruppe des Sehfärbstoffs Rhodopsin, dessen Absorptionsmaximum bei 500 nm liegt, absorbiert. Innerhalb von Pikosekunden vollzieht sich die Stereoisomerisation vom 11-cis- zum All-trans-Retinal und innerhalb weiterer weniger Millisekunden über Zwischenstufen zu Metarhodopsin II. Aus dieser Umwandlung folgt, dass die äußere Stäbchenmembran vermindert für Natrium- und Calciumionen durchlässig wird; es kommt zur Hyperpolarisation der Rezeptorzelle, die in Ruhe dauerdepolarisiert vorliegt. Dies führt an den Synapsen zu einer verminderten Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat. (6) Durch die Verschaltung mehrerer Rezeptoren und Bipolarzellen, auch über Interneurone, die auf eine Ganglienzelle konvergieren, entstehen rezeptive Felder. Über ein System von On- und Off-Zentrum-Bipolar- und -Ganglienzellen wird Hell- und Dunkelwahrnehmung sowie Kontrastentstehung ermöglicht. (6) Um für erneute Phototransduktionsprozesse zur Verfügung zu stehen, wird das All-trans-Retinal im retinalen Pigmentepithel zu All-trans-Retinol (Vitamin A) reduziert und dann in die 11-cis-Form überführt, wonach es wieder zur Bildung von 11-cis-Retinal bereit ist. (6)

In den Zapfen laufen vergleichbare Vorgänge ab. Reaktion, Zerfall und Resynthese gehen jedoch schneller vonstatten als bei den Stäbchen und die Empfindlichkeit der Zapfen ist geringer. (6) Zapfen sind für das Tages- und Farbsehen verantwortlich. Die Differenzierung verschiedener Farben wird durch das Vorkommen dreier verschiedener Zapfenarten mit Absorptionsmaxima unterschiedlicher Wellenlängen ermöglicht: kurzwelliges Blau bei 420 nm, mittelwelliges Grün bei 535 nm und langwelliges Rot bei 565 nm. Im Sinne der additiven Farbmischung interagieren zwei bis drei mehr oder weniger erregte Zapfentypen innerhalb eines Netzhautareals miteinander und führen im Gehirn zu einer bestimmten Farbwahrnehmung. (6) Analog zur Signalverarbeitung bei den Stäbchen entstehen auch hier rezeptive

Felder, die über On- und Off-Zentrum-Zellen auf der Ebene der Ganglienzellen auf Gegenfarben und auf der Ebene des Kortex auf Doppelgegenfarben reagieren. (6)

I.3. Retinopathien

Es treten eine Reihe von Netzhauterkrankungen auf, die durch den Tod von Neuronen gekennzeichnet sind. Sie können sowohl erworben als auch hereditär bedingt sein. Exemplarisch sollen im Folgenden drei dieser Retinopathien dargestellt werden.

I.3.1. Netzhautablösung

Die Ablatio retinae gehört zu den degenerativen Erkrankungen der Netzhaut. Oft löst sich dabei die Pars sensorica retinae von dem unterliegenden retinalen Pigmentepithel infolge von Netzhautenrissen und Eindringen von Flüssigkeit in den Spaltraum. Kommt es zur Ablösung, was mit erhöhter Inzidenz im Alter aufgrund degenerativer Veränderungen der peripheren Netzhaut und des Corpus vitreum vorkommt, ist das Sehvermögen akut bedroht und setzt sich bei Nichtbehandlung in den meisten Fällen infolge eines Absterbens der betroffenen Neurone in eine Erblindung fort. In ca. 15-20% der Fälle sind beide Augen beteiligt; es besteht eine familiäre Disposition zur Netzhautablösung. (12)

I.3.2. Makuladegeneration

Die Makula lutea ist der Ort höchster Sehschärfe in einem umschriebenen Netzhautareal von etwa 5 mm Durchmesser; in ihrem Zentrum befindet sich eine gefäßfreie Einsenkung, die Fovea centralis. Treten degenerative Veränderungen in diesem Bereich der Netzhaut auf, die meist zu erheblichen und irreversiblen Störungen der Sehschärfe führen, spricht man von einer Makuladegeneration. (12) Die Makuladegeneration kann zunächst einmal altersbezogen durch eine unzureichende Stoffwechselleistung des retinalen Pigmentepithels auftreten, wobei an der Entstehung sowohl eine genetische Prädisposition als auch phototoxische

Effekte beteiligt sein sollen. Infolge einer Ansammlung der Abbauprodukte von Rezeptoraußengliedern als Drusen gehen die Pigmentepithelzellen zugrunde, es entstehen Risse in der Bruch-Membran und Gefäße der Choroidea wachsen unter Anhebung der Retina ein. (12) Die Folgen für das Überleben der retinalen Neurone stellen sich analog zu denen der peripheren Netzhautablösung dar (s. I.3.1.). Defekte im retinalen Pigmentepithel und der Bruch-Membran können darüber hinaus auch durch Myopie mit chorioatrophischen Narben, die als Dehnungsherde fungieren, verursacht werden. (12) Bei der Retinopathia centralis serosa kommt es nach einem ätiologisch unklaren, mit Stress assoziierten Defekt des retinalen Pigmentepithels zu einer serösen Netzhautabhebung. (12)

I.3.3. Retinopathia pigmentosa

Die mit einer Prävalenz von 1:4000 häufigste hereditäre Retinopathie ist die Retinopathia pigmentosa (früher Retinitis pigmentosa). Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch progrediente Dystrophie der Sinneszellen – vor allem der Stäbchen – und des retinalen Pigmentepithels. Später greift die Degeneration auf die übrigen Netzhautschichten bis hin zum Nervus opticus über. (12) Es ist umstritten, ob die Degeneration über einen apoptotischen Signalweg abläuft. (13) In 50-60% liegt eine autosomal-rezessive, in 30-40% autosomal-dominante, in 5-15% eine X-chromosomal-rezessive Vererbung vor; die übrigen Fälle treten sporadisch auf. (10,12) Es wurden bereits über 45 ursächliche Gene gefunden, wobei man von einer monogenetischen Ursache ausgeht. (10) Die Patienten leiden unter Nachtblindheit, hochgradigen konzentrischen Gesichtsfeldeinschränkungen und merklicher Herabsetzung der Sehschärfe, in der Regel erblinden sie schlussendlich. (12) Derzeit ist keine Kausaltherapie möglich, lediglich eine Verlangsamung der Progredienz kann über eine Nahrungsergänzung mit Vitamin A, Omega-3-reichem Fisch (Docosahexaensäure, DHA), Lutein, Kalziumblockern und Ascorbinsäure erreicht werden. (10,14) Diese Stoffe sollen die retinalen Zellen vor Oxidation schützen, Schlüsselemente der Stäbchen und Zapfen optimieren und eine effektive Oxygenierung der Sinneszellen durch die retinale Blutversorgung gewährleisten. (14)

I.4. Embryonale Entwicklung des Auges

I.4.1. Entstehung der Strukturen des Bulbus oculi

Die Embryonalentwicklung des Auges ist ein komplexer Vorgang, an dem Zellen des Neuroektoderms, des Kopfmesenchyms und des Oberflächenektoderms beteiligt sind; alle entstammen dem Ektoderm. (8,15) (s. Abb.3)

Man kann drei Perioden in der pränatalen Augenentwicklung unterscheiden: die *Embryogenese*, die sich von der Befruchtung bis zum Erscheinen der Augengruben erstreckt und charakterisiert wird durch die Etablierung einer primären Organanlage, die *Organogenese*, welche die Entwicklung der primären rudimentären Anlagen einzelner Organe umfasst und schließlich die längste und bis nach der Geburt andauernde Phase der *Differenzierung* primitiver Organe zu voll oder partiell aktiven Organen. (16)

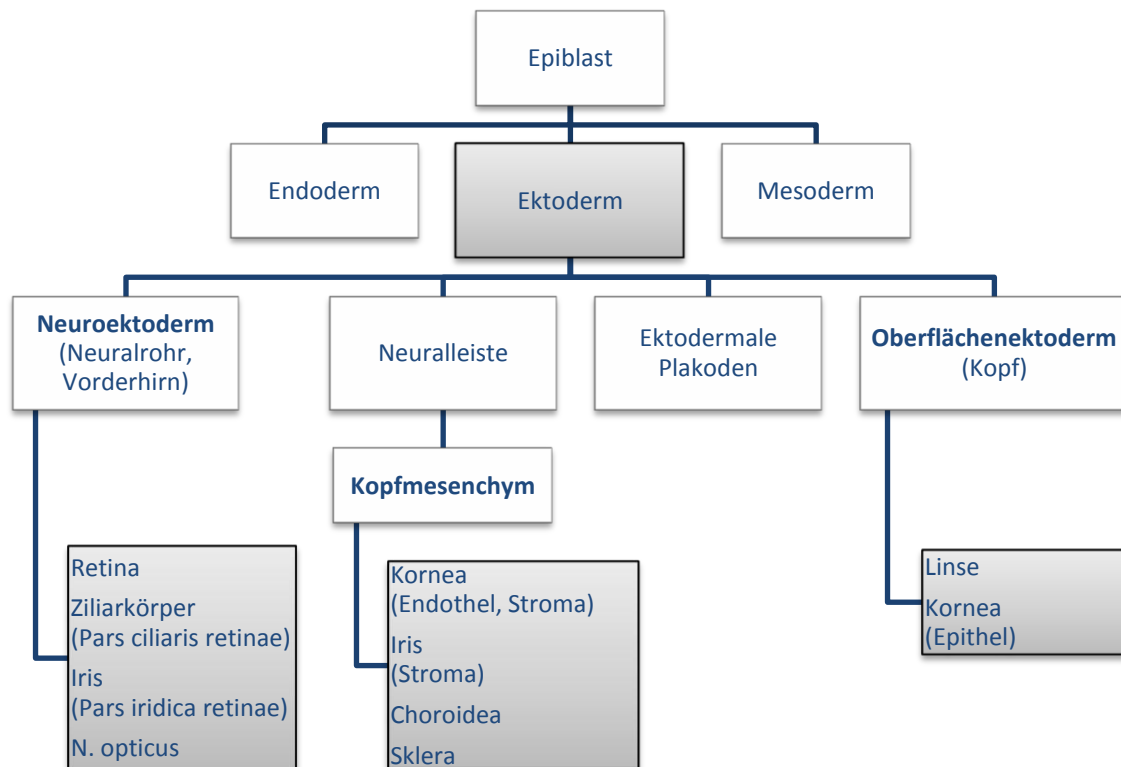


Abbildung 3: Ursprungsgewebe der Augenanlage/ Abstammung aus den drei Keimblättern, modifiziert aus (15)

Die Entwicklung der Augen beginnt mit der Bildung beidseitiger Augengruben (Sulci optici) auf der Innenseite der kranialen Neuralfaltens. Das Epithel der Augengruben stülpt sich während der Vorderhirnentstehung in das umliegende Mesenchym ein und formiert sich als Ausstülpung des Prosencephalons (17) zu den Augenbläschen. In Folge des Wachstums der Augenbläschen Richtung lateral und Ausdehnung derer distalen Anteile entsteht proximal der Augenstil, welcher im Lumen verengt ist. Durch in Kontakt treten der Augenbläschen mit dem Oberflächenektoderm verdickt sich dieses im Bereich des Aufeinandertreffens zu den sogenannten Linsenplakoden, die sich anschließend zunächst in das unterliegende Gewebe zur Bildung der Linsengruben einsenken, dann zu sphärischen Linsenbläschen verschmelzen und schließlich den Kontakt zum Oberflächenektoderm gänzlich verlieren. (15) In der weiteren Entwicklung der Linse wird die Vorderwand des Linsenbläschens das isoprismatische Linsenepithel bilden und die Zellen der Hinterwand werden sich zu schlanken, hochprismatischen Zellen verlängern, bis sie das gesamte Lumen des Bläschens ausfüllen. Die Kerne des hinteren Linsenepithels lösen sich später auf und in den Zellen werden lichtdurchlässige Kristalline zur intrazellulären Ablagerung gebildet (18); es entstehen hochtransparente primäre Linsenfasern. Die Ernährung der Linsenfasern geschieht zu diesem Zeitpunkt bereits durch Diffusion aus dem Glaskörper und Kammerwasser. (15) Später erreicht die Linse ihre elliptische Form. Fortwährend werden neue sekundäre Linsenfasern aus Zellen der Äquatorialzone an den Linsenkern angelagert. (17)

Das Linsenbläschen sezerniert außerdem Faktoren, die in einem Abschnitt des Oberflächenektoderms die Differenzierung zum vorderen Kornealepithel induzieren. Zwischen diesen Abschnitt der späteren Kornea und das darunter liegende Linsenbläschen wandern Neuralleistenzellen (mesenchymale Zellen) ein und bilden mit einer vom Oberflächenektoderm sezernierten Matrix das Kornealstroma sowie unter Ausbildung von Zell-Junctions das hintere Kornealendothel. (11,15)

Gleichzeitig stülpen sich während der Linsenbläschenbildung auch die Augenbläschen zu doppelwandigen Augenbechern ein; das Lumen zwischen innerem und äußerem Blatt des Augenbeckers, welches als Sehventrikel bezeichnet wird und eine direkte Verbindung zum sich entwickelnden dritten Hirnventrikel darstellt (19), verengt sich zunehmend, bleibt aber noch bis in die frühe Fetalperiode

erhalten. Aus den Wänden des Augenbechers entwickelt sich die Retina, wobei das äußere Blatt das retinale Pigmentepithel (Stratum pigmenti, s. I.1.3.) und das innere Blatt, welches sich bereits während der Einstülpung beginnt zu verdicken, das Stratum nervosum bildet. (15) Das Stratum nervosum gliedert sich wiederum schon früh auf in eine Ventrikulärzone (zum Sehventrikel hin gelegen), in der Mitosen stattfinden, und eine Marginalzone, in die die postmitotischen Proneurone anschließend einwandern. (20) Als erste Zellen entstehen aus den multipotenten retinalen Progenitorzellen in der Ventrikulärzone Proneurone der Ganglienzellen, dicht gefolgt von Stäbchen, Horizontal- und Amakrinen Zellen. (21) Die Pigmentierung des äußeren Augenbecherblatts ist ein Ergebnis des Kontakts mit sich entwickelnden Kapillaren des periokulären Mesenchyms (16), in dem das Pigmentepithel außerdem die Bildung der Choroidea und Sklera induziert. (15) Choroidea und Sklera setzen sich zu einer Ummantelung des N. opticus fort, welche den Hirnhäuten Pia mater, Arachnoidea und Dura mater entspricht. (17)

Die Ränder des Augenbechers bewegen sich im weiteren Verlauf aufeinander zu und umschließen dabei das jeweilige Linsenbläschen; an der ventralen Oberfläche bleibt eine Fissur bestehen, die Augenbecherspalte. Durch diese Einbuchtung gelangt Mesenchym in das Innere des Augenbechers, den späteren Bereich des Corpus vitreum. Aus dem Augenbechermesenchym bilden sich unter anderem versorgende Gefäße, die Arteria und Vena hyaloidea, des inneren Augenbecherblattes, des Linsenbläschens und des Mesenchyms selbst. Diese Glaskörpergefäße werden im Zuge der Verschmelzung der Augenbecherspalte von distal aus immer mehr vom N. opticus, welcher im Augenbecherstil infolge ständig zunehmender Zellzahl der Neurone sowie Neurogliastützzellen und Verschmelzung des inneren und äußeren Augenbecherblattes entsteht (17), eingeschlossen; im voll entwickelten Auge bleiben sie im proximalen Anteil als Arteria und Vena centralis retinae zur Ernährung der Retina (17) erhalten. Ihre distalen Anteile degenerieren im Laufe der weiteren Embryonalentwicklung und hinterlassen einen im adulten Auge kaum sichtbaren Canalis hyaloideus. (15)

Wie schon beschrieben, teilt sich das Stratum nervosum der Retina nach dem Verschluss der Augenbecherspalte in eine äußere Ventrikulärzone und eine innere Marginalzone auf. Die ersten Ganglienzellen beginnen nun, gefolgt von Müllerzellen,

aus der Ventrikulärzone heraus in die marginale Zone der Retina zu wandern. (8,16) Zellen der Marginalzone generieren Amakrine Zellen und Müllerzellen, Zellen der Ventrikulärzone differenzieren zu Photorezeptoren, Bipolaren Zellen und Horizontalzellen, wobei letztere beiden anschließend in die innere marginale Zone wandern. (8) Die Differenzierung zur typischen zehnfachen retinalen Schichtung geschieht in einem komplexen Zusammenspiel von Genese und programmiertem Zelltod von zentral nach peripher und außerdem von innen nach außen gerichtet, sodass die Photorezeptoren ihr als letzter Zelltyp unterliegen. (16) Die Photorezeptoren bilden sich aus Zellfortsätzen der Sinneszellen, deren Perikarya in der äußeren Körnerschicht liegen. (17) Die zellulären Schichten beginnen synaptische Verbindungen untereinander aufzubauen, die Axone der Ganglienzellen wachsen in Richtung des Augenszils. (8) Nach und nach bilden sich von zentral nach peripher zwei Gefäßnetze – ein tiefes und ein oberflächliches – innerhalb der Retina aus. (16)

Das Lumen, welches das innere Blatt des Augenbechers umschließt, entspricht dem des späteren Corpus vitreum. Die Sekretion der ausfüllenden Flüssigkeit beginnt bereits früh: im primären Glaskörper durch das hintere Linsenepithel, später im sekundären Glaskörper zusätzlich durch Mesenchymzellen, die die Arteria hyaloidea umgeben. (15)

Der Ziliarkörper bildet sich distal der Ora serrata aus dem Mesenchym, welches den Augenbecher umgibt. An der inneren Oberfläche des Augenbechers bildet sich auf dieser Höhe aus den distalen Anteilen des Augenbechers das zweischichtige Ziliarepithel mit Ziliarfortsätzen samt Verbindung zur Linse durch Zonulafasern, die sich aus lockerem Mesenchym bilden, sowie der M. ciliaris. Letztendlich wird die Produktion des Kammerwassers durch die innere Zellschicht des Augenbechers, also das Epithel der Ziliarzotten, übernommen. (15,17)

Nach distal gehen die beiden Epithelschichten des Ziliarkörpers kontinuierlich in das Irisepithel über. Die Pigmentierung des äußeren Augenbecherblattes dehnt sich schon in der frühen Embryonalentwicklung auch auf das innere Blatt aus, sodass die Iris komplett undurchlässig für einfallendes Licht wird und dem optischen System als Blende dienen kann. Aus den Zellen des vorderen Irisepithels bilden sich der M.

dilatator pupillae sowie M. sphincter pupillae, welche im Falle des M. dilatator pupillae sogar pigmentiert bleiben. (15)

Direkt vor der Linse und Iris liegt als Fortsetzung der Choroidea die Membrana iridopupillaris. (17,18) Sie stellt die hintere Begrenzung der im Mesenchym entstehenden vorderen Augenkammer dar, nach anterior wird die Begrenzung durch das hintere Kornealendothel gebildet. In Normalfall bildet sich die Membrana iridopupillaris vollständig zurück; es kommt vor, dass einzelne Bindegewebsfasern vor der Pupille persistieren. (17)

Die Strukturen des Kammerwinkels, namentlich das Trabekelwerk und der Schlemm-Kanal, die dem Abfluss des Kammerwasser dienen, entwickeln sich im vorderen Augenabschnitt als letzte; d.h. sie sind beim Menschen erst zum Zeitpunkt der Geburt und bei der Maus sogar erst am postnatalen Tag 21 zum Großteil ausgebildet. (11,22,23) Mesenchymale Zellen wandern in den Kammerwinkel ein, verlängern sich dort und flachen ab; zwischen ihnen bilden sich Räume mit extrazellulärem Faserwerk zum Trabekelwerk aus. Der Schlemm-Kanal bildet sich in Kontakt zum Trabekelwerk aus in der Sklera, nahe dem Kammerwinkel gelegenen Gefäßen, die sich zu einem umlaufenden endothelialen Kanal zusammenschließen. (11)

Am Tag der Geburt ist die Augenentwicklung beim Menschen weitgehend abgeschlossen. Lediglich die Iris unterliegt im Folgenden der Pigmentierung, der Bildung von Krypten und einer Zunahme des Kollagenanteils im Stroma. Die Retina bedarf im Bereich der Macula lutea und Fovea centralis bezüglich der Ganglien- und Bipolarzellen einer örtlichen Umorientierung; ebenso ist die Fähigkeit zu skotopischem Sehen zum Zeitpunkt der Geburt noch unzureichend und auf eine Reorganisation im Bereich der Photorezeptoren angewiesen. (8,16)

I.4.2. Beteiligte Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle

An der Initiierung sowie dem Ablauf der Augenentwicklung und einer regelrechten Morphogenese des Auges sind vor allem molekulare Faktoren wie der Transkriptionsfaktor Pax 6 und Signalmoleküle wie das Bone Morphogenetic Protein-

4 (BMP4), Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2), Fibroblastenwachstumsfaktor-8 (FGF8) und Sonic Hedgehog (Shh) beteiligt. (11,15)

Sonic Hedgehog unterteilt das zunächst unpaare Augenfeld in zwei getrennte Augenanlagen und sorgt im Augenbecherstil für eine Herunterregulierung von Pax 6, das im unpaaren Augenfeld zunächst in der vorderen Begrenzung der Neuralplatte exprimiert wird. Durch diese Herunterregulierung im Augenbecherstil wird vor allem im Augenbecher und der Linse die Bildung von anderen Genen durch Pax 6 gefördert. (17) Die Differenzierung des inneren Augenbecherblatts zur Retina sowie die Proliferation, Migration und Differenzierung der Linsenzellen wird durch FGF aus dem Oberflächenektoderm bestimmt. (17,18) Pax 6 kommt im Bereich des vorderen Augenabschnitts eine zentrale Bedeutung zu: Mutationen innerhalb des Gens können zu vielfältigen Störungen bis hin zum Fehlen von okulären Organanlagen, wie einer Aniridie, führen. (11,15) Doch auch im hinteren Augenabschnitt wird Pax 6 für die multipotente Differenzierung retinaler Zellen aus Progenitorzellen verantwortlich gemacht. Nach Inaktivierung von Pax 6 konnte im Tiermodell die ausschließliche Bildung von Amakrinen Interneuronen verzeichnet werden. (24) Viele weitere Transkriptionsfaktoren wie PITX2, PITX3, FOXE3, FOXC1 und c-MAF, die allerdings nicht wie Pax 6 in allen okulären Geweben exprimiert werden, beeinflussen ähnliche Prozesse innerhalb der Augenentwicklung. (11) Fehlerhafte Interaktion der Transkriptionsfaktoren sowie Genmutationen innerhalb dieser resultieren in Dysgenesien, v.a. des vorderen Augenabschnitts, die mit unvollständiger Ablösung des Linsenbläschens vom Oberflächenektoderm, unvollständigem Verschluss des Linsenbläschens und Trübungen der Kornea einhergehen und somit die visuelle Funktion wesentlich reduzieren. Beim Menschen wird solch ein resultierender Phänotyp mit Peters' Anomalie betitelt. (11)

I.5. Der TGF- β Signalweg

Der bereits genannte Transforming growth factor- β (TGF- β) ist ein multifunktionelles Zytokin, das der TGF- β Superfamilie angehört. Die TGF- β Superfamilie hat über 50 Zugehörige, darunter bone morphogenetic proteins (BMPs), Activine, Inhibine,

growth/differentiation factors (GDFs) oder die Subfamilie des glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). (25)

Bei Säugetieren sind drei Isoformen bekannt: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. (27–29) Zwei weitere wurden bei Hühnern (TGF- β 4) (30) und Fröschen (TGF- β 5) (31) gefunden. Alle Zugehörigen der TGF- β Superfamilie werden als Präproteine synthetisiert, die nach Abspaltung ihres Signalpeptids und ihrer Prodomäne ein 110–140 Aminosäuren großes Fragment darstellen und erst anschließend durch Hetero- oder Homodimerisation biologische Aktivität erlangen. (32) Gemeinsames strukturelles Motiv der TGF- β Superfamilie ist der „Cystin-Knoten“, der sich aus sechs, über drei intramolekulare Disulfidbrücken verbundenen, Cysteinresten zusammensetzt. Zwei der drei Disulfidbrücken bilden dabei einen achteckigen Ring aus, der durch die dritte gekreuzt wird. Bei den meisten TGF- β Familienangehörigen, nicht zum Beispiel bei GDF-3, -9 oder Ebf, kommt eine siebte Aminosäure Cystein vor, welche zwei Monomere über eine Cystinbrücke intermolekular zum funktionellen Dimer verknüpft. (32) Hydrophobe Kräfte sorgen für zusätzlichen Zusammenhalt zwischen den Dimeren. (33)

Zuständig für die Signaltransduktion von Mitgliedern der TGF- β Superfamilie, ausgenommen GDNF, sind zwei transmembranäre Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren von einer Größe zwischen 55 und 70 kDa sowie intrazelluläre Smad-Proteine. (33) Bezogen auf TGF- β als Ligand bezeichnet man die Rezeptoren als TGF- β -Rezeptor Typ I (TGF- β -R1) und Typ II (TGF- β -R2). (33) Zwei Rezeptoren vom Typ III, auch als Betaglycan und Endoglin bezeichnet, sind darüber hinaus bekannt, sie haben möglicherweise modulierende Funktion bei der Ligandenbindung durch die Signalrezeptoren. (32,33) Smad-Proteine lassen sich nach Subfamilien einteilen in rezeptorregulierte R-Smads, von denen Smad 2 und 3 Substrate des TGF- β -R1 sind und Smad 1, 5 und 8 Mediatoren von BMP-Signalen darstellen, mitwirkende Co-Smads (Smad 4) und inhibitorische I-Smads, von denen Smad 6 vor allem den BMP-Signalweg und Smad 7 sowohl den BMP- als auch den TGF- β -Signalweg hemmt. (33,34) Alle Smads bestehen aus einer N-terminalen MH1-Domäne und einer C-terminalen MH2-Domäne mit einer dazwischen liegenden verknüpfenden Region variabler Länge und Sequenz, denen verschiedene Funktionen zugesprochen werden. (33,35)

Als Ligand bindet TGF- β an den TGF- β -R2, welcher mit dem TGF- β -R1 einen heterotetrameren Komplex bildet, woraufhin der TGF- β -R1 in seiner sogenannten GS-Domäne durch den TGF- β -R2 phosphoryliert und somit aktiviert wird. Der TGF- β -R1 phosphoryliert in der Folge mit Hilfe des membrangebundenen Proteins SARA und dem Adaptermolekül Dab2 erste Smad-Proteine, nämlich Smad 2 und 3, an ihren Serin-Resten. (26,33,35) Diese R-Smads bilden nach ihrer Aktivierung durch den Rezeptor mit Co-Smad 4 einen heteromeren Komplex, wandern gemeinsam in den Nukleus und regulieren dort die Gentranskription. (26) (s. Abb.4)

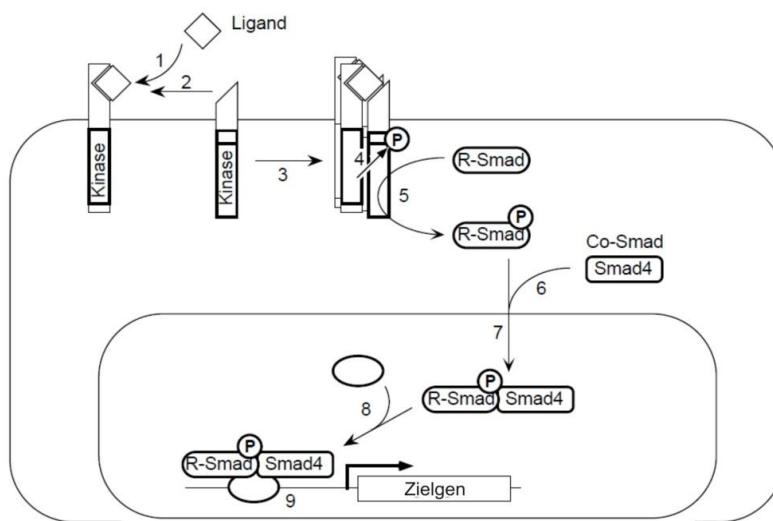


Abbildung 4: TGF- β Signalweg

Der Ligand bindet an den TGF- β -R2 (1), welcher mit dem TGF- β -R1 unter Phosphorylierung einen Rezeptorkomplex bildet (2-4). Nach erfolgter Aktivierung phosphoryliert der TGF- β -R1 ein R-Smad Protein (5), das sich im Folgenden mit Smad 4 komplexiert (6). Beide wandern gemeinsam in den Nukleus (7). Dort assoziiert der Smad-Komplex mit einem DNA-bindenden Partner (8), um an Promotoren spezifischer Zielgene binden zu können (9) und deren Transkription zu regulieren. Modifiziert aus (33)

Die I-Smad beeinflussen den TGF- β Signalweg im Sinne einer negativen Feedback-Schleife durch Inaktivierung des Rezeptorkomplexes durch Ubiquitinligasen, wie zum Beispiel Smurf 1 und 2, oder die Proteinphosphatase I. (35) Auch R- und I-Smads stellen Angriffspunkte für Smurf 1 und 2 dar; sie stehen nach Ubiquitinierung dem Proteasom zum Abbau bereit. Die Ubiquitinierung hat somit positive sowie negative Effekte auf die Transkriptionsantwort des TGF- β Signalwegs, wobei ein überwiegend

positiver Einfluss vermutet wird. (35) Zusätzlich greifen I-Smad in die Komplexbildung von R- mit Co-Smads sowie zwischen DNA und Smad-Komplex ein (35) und verhindern die Phosphorylierung von R-Smads am aktivierten Typ I Rezeptor im Sinne eines kompetitiven Antagonismus (36).

Auf der Ebene der Smads kann der TGF- β Signalweg auf vielfältige Weise sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden, nicht nur durch Ubiquitinierung (s.o.), sondern auch durch Acetylierung, welches die DNA-Bindungswahrscheinlichkeit verändert, durch Phosphorylierung, zum Beispiel durch MAPKs wie Erk, JNK und p38 MAP Kinasen oder auch durch Rekrutierung von den Smad Co-Repressoren c-Ski und SnoN. Letzteres ist ein direktes Zielgen von TGF- β und wirkt somit im Sinne eines negativen Feedbacks, indem es heteromere Smad-Komplexe spaltet und mit Smad 2 und 3 interagiert. (35,36)

TGF- β übernimmt Funktionen in unterschiedlichsten Bereichen und Vorgängen des Organismus, wie der Proliferation, der Morphogenese, der Zelldifferenzierung, des Gewebeumbaus, der Embryonalentwicklung, der Zellwanderung, der Hämatopoese, der Angiogenese, der Chemotaxis, innerhalb des Immunsystems und bei der Apoptose. (25,26)

I.6. Der Programmierte Zelltod

Der Programmierte Zelltod, auch als Apoptose bezeichnet, ist im Gegensatz zur Nekrose, die nach Schädigung einer Zelle eintritt, definiert als ein aktiver, durch Genaktivitäten gesteuerter und physiologischer Differenzierungsprozess der Zelle. (37) Das wohl bekannteste Beispiel für physiologisch auftretenden Zelltod beim Menschen ist die interdigitale Apoptose während der Entwicklung eines Embryos. Während der gesamten Embryogenese kommt es in besonderer Hinsicht auf ein kontrolliertes Verhältnis zwischen Proliferation und Zelltod an, um verschiedenste Zellen regelrecht in entsprechende Gewebe zu integrieren und Organen Form zu geben. (38,39) Gerät das Kontrollsystem des programmierten Zelltods aus der Reihe, können daraus verschiedene Krankheiten resultieren: Tumorentstehung beispielsweise bei verminderter Apoptoseleistung und Myopathien, Chorea Huntington oder Alzheimer bei übermäßigem Ablauf von Apoptose. (37)

Erste Beschreibungen über das Absterben von Zellen gab es bereits im Jahr 1885 (37), 1951 griff Glücksmann das Thema wieder auf. Er unterteilte die apoptotischen Vorgänge in morphogenetischen, histogenetischen und phylogenetischen Zelltod. (38) *Morphogenetischem* Zelltod gehe eine Formveränderung epithelialer Organe voraus und laufe zum Beispiel bei der Einstülpung des Augenbechers aus dem Oberflächenektoderm oder der Trennung der Linse von selbigem ab, der *histogenetische* Zelltod diene der Differenzierung von Geweben und Organen, beispielsweise der Retina und einem *phylogenetischen* Zelltod unterlägen rudimentäre Organe wie die Urniere. (38)

In der Entwicklung des Nervensystems von Wirbeltieren wird der Programmierte Zelltod als bedeutend gesehen, so erfüllt er morphogenetische Funktionen bei der Schließung des Neuralrohrs (40) oder durch negative Selektion von Progenitorzellen aus einer nicht regelrechten Region innerhalb des sich entwickelnden ZNS (41). Oppenheim beschreibt eine erhebliche Anzahl von 20-80% Neuronen innerhalb einer angegebenen Population, die dem Programmierten Zelltod unterliegen. (42)

Im Durchlauf des Programmierten Zelltods verändert sich die Morphologie der Zelle in zwei getrennten Phasen: Zuerst schrumpft die Zellmembran unter Wasserverlust zusammen, was die Zelle dichter erscheinen lässt, in der Zytoplasmamembran bilden sich durch den Abbau des Zytoskeletts Blasen aus und es treten sogenannte apoptotische Körperchen als membranöse Abschnürungen auf. (37,43) Gleichzeitig fragmentiert innerhalb einer intakten Kernmembran der Zellkern und das Chromatin kondensiert. Die Überreste der Zellen werden im Anschluss von Makrophagen aufgenommen und zersetzt. (37,43)

1993 wurde man sich bewusster über den molekularen Ablauf der Apoptose, der über die Aktivierung spezieller Cysteinproteasen, später als Caspasen bezeichnet, gesteuert wird. (44,45) Bei der Aktivierung der Caspasen kann zwischen einem extrinsischen und einem intrinsischen Signalweg unterschieden werden, die beide in der Aktivierung der gleichen Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6, 7) enden. (46) Bei ersterem wird die Bindung eines Liganden über einen transmembranösen Rezeptor der TNF-Familie (v.a. Fas-Rezeptor) ins Zellinnere weitergeleitet, auf intrinsischem Weg werden die Initiatorcaspasen (Caspasen 8, 9, 10) über Mitochondrien aktiviert. Die Membran der Mitochondrien erhöht dazu ihre Permeabilität und Cytochrom c

wird ins Zytosol entlassen; Cytochrom c lagert sich dann mit Apaf-1, einem Adaptorprotein, und Caspase 9, die hierdurch aktiviert wird, zum einem Aggregat zusammen, das Apoptosom genannt wird. (37,46) Ist die direkte Aktivierung der Caspasen über den extrinsischen Weg nicht ausreichend, kann über die Spaltung des Proteins Bid, das sich nachfolgend an die Mitochondrienmembran anlagert, der intrinsische Signalweg aktiviert werden. Somit besteht eine Verbindung zwischen den beiden Signalwegen. (37) Caspasen liegen zunächst inaktiv in jeder Zelle vor, nach Aktivierung einer ersten Initiatorcaspase durch Proteolyse wird eine, ca. eine Stunde dauernde, unaufhaltsame Kaskade ausgelöst an deren Ende die Spaltung einiger weniger, bestimmter Substrate der Zellen steht. (37) Exemplarisch seien hier als Substrate Bcl-2 oder PAK2 genannt. (37)

Ein weiterer intrinsischer Signalweg wird vermutet, der über die Ansammlung missgefalteter Proteine und Veränderungen der Kalziumhomöostase im Endoplasmatischen Retikulum zu Stress und nachfolgend über Caspase 12 und 9 zur Einleitung von Apoptose führt. (46) Als inhibierende Moleküle der Apoptose werden IAPs exprimiert, die selektiv Initiator- und Effektorcaspasen binden und somit inaktivieren. (37)

Zusätzlich existieren Caspase-unabhängige Signalwege der Apoptose, die durch den sogenannten AIF induziert werden. (47) AIF wird auf einen Stimulus hin aus dem transmembranären Raum der Mitochondrien ins Zytosol und den Nukleus entlassen, um dort seine Wirkung zu entfalten. Beim Zelltod der Photorezeptoren scheint dieser Signalweg eine entscheidende Rolle zu spielen. (13,48)

Auch der TGF- β Signalweg hat entscheidenden Einfluss auf den Programmierten Zelltod, was bereits in mehreren Untersuchungen herausgestellt wurde. Es gibt zum Einen Beobachtungen über verminderte retinale Apoptose unter Ausschaltung der TGF- β Signalwirkung (26,49,50), zum Anderen wird vermehrte neuronale Apoptose beschrieben (51). Die Wirkung von TGF- β auf retinale Neurone bleibt somit bislang unklar und bedarf weiterer Investigation. Es erscheint sinnvoll, dafür ein bestimmtes System, nämlich das Cre/loxP Rekombinationssystem, zu nutzen, das es erlaubt, zelltypspezifisch in Neuronen der Retina den TGF- β Signalweg zu hemmen, somit die frühe embryonale Letalität unter systemischem Knockout des TGF- β -R2 (52) zu umgehen und Licht in das Dunkel um die unklare Datenlage zu bringen.

I.7. Das Cre/loxP Rekombinationssystem

Rekombinasen katalysieren innerhalb des Organismus ganz allgemein die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA. Sie geben damit die Möglichkeit zur Reparatur von Mutationen und genetischer Vielfalt. (53) Nach vielen Jahren der Forschung ist man sich seit 1999 über die Wirksamkeit einer bestimmten Rekombinase, der Cre-Rekombinase, bewusst. (54) Die Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 katalysiert unabhängig von anderen Cofaktoren die Rekombination zwischen zwei sogenannten loxP Sites in jeglicher Art von DNA. (55,56) Diese loxP Sites sind 34 bp groß und setzen sich zusammen aus zwei palindromischen Sequenzen von 13 bp (5'-ataacttctgata-3') mit einem dazwischen liegenden Element aus 8 bp (5'-gcatacat-3'). (55) Ein durch zwei gleichgerichtete loxP Sites flankierter DNA-Abschnitt wird als „gefloxt“ bezeichnet und durch die Cre-Rekombinase, unter Zurücklassen einer der loxP Sites, herausgeschnitten. Anschließend wird dieser DNA-Abschnitt intrazellulär abgebaut. (53) In Umkehr dazu lässt sich eine zirkuläre, loxP Site enthaltende DNA in eine lineare DNA integrieren, außerdem katalysiert die Cre-Rekombinase je nach Ausrichtung der loxP Sequenzen auch Translokationen oder Inversionen flankierter Genabschnitte. (57)

Aus diesen Vorgängen leitet sich das Cre/loxP Rekombinationssystem ab, welches, wie auch in vorliegender Arbeit, insbesondere zur Schaffung konditioneller Knockout Mäuse verwendet wird. (54) Zur Generierung einer Maus, die einer Cre/loxP-vermittelten Gendeletion unterliegt, bedarf es zweier verschiedener Mauslinien. Dies ist zum einen eine Cre-Maus, die nach Einbringen des Cre-Transgens in ihr Genom gewebespezifisch in bestimmten Zielzellen Cre-Rekombinase exprimiert. Um Gewebespezifität zu erreichen und den Zeitpunkt der Exprimierung absehen zu können, bringt man das Cre-Transgen hinter einem Promotor ins Genom ein unter dessen Kontrolle es folglich steht. (53) Im Falle der hier verwendeten α -Cre Mäuse steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Alpha Enhancer Elements des Pax 6 Promotors. Dieser erlaubt eine spezifische Expression der Cre-Rekombinase in neuronalen, retinalen Vorläuferzellen. Der Transkriptionsfaktor Pax 6 wird im Auge schon ab dem Embryonaltag E 8.5 exprimiert (58), was bedeutet, dass ab diesem Zeitpunkt auch die Cre-Rekombinase aktiv wird und nach einer gewissen Verzögerung durch Transkriptions- und Translationsvorgänge Wirkung zeigt. (55)

Pax 6 wird in diesem frühen Stadium der Embryogenese außerdem in einigen Regionen des Gehirns, des Neuralrohrs, des Nasenepithels und der Hypophyse exprimiert. (58)

Die andere benötigte Mauslinie beinhaltet den „geflochten“ Genabschnitt. Dieser umfasst in der Regel ein wichtiges Exon des Zielgens, das durch homologe Rekombination mit loxP Sites flankiert und in die Keimbahn eingebracht wurde. Es wird dabei darauf geachtet, dass das Zielgen trotz Flankierung funktionsfähig bleibt, um Veränderungen im Phänotyp des transgenen Tiers zu vermeiden, ehe die Cre-Rekombinase eine Deletion des Gens durchführt. (59,60) Die in vorliegender wissenschaftlicher Untersuchung verwendeten TGF- β -R2^{fl/fl} Mäuse tragen die floxP Sequenzen das Exon 2 (61) und die Smad7^{fl/fl} Mäuse die floxP Sequenzen das Exon 1 (62) flankierend.

Die beiden getrennt voneinander generierten Mauslinien werden anschließend mit α -Cre Tieren gekreuzt, um Nachkommen mit gewebespezifischem Gen Knockout zu erhalten.

I.8. Zielsetzung der Arbeit

I.8.1. α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Mäuse

Zwei Mauslinien sollen miteinander verpaart werden, α -Cre Mäuse mit Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promotors Pax 6 und transgene Mäuse mit einem „geflochten“ TGF- β -R2 Gen, um trächtige Muttertiere zu erhalten, deren Embryonen die zelltypspezifische Deletion des TGF- β -R2 in den retinalen Neuronen tragen. Es soll die Auswirkung des TGF- β Signalwegs auf den programmierten Zelltod in der Retina während der Embryonalentwicklung untersucht werden. Bisher wurden Untersuchungen dazu nur unter konventionellem Knockout des TGF- β -R2 oder Immunoneutralisation der TGF- β Isoformen durchgeführt. (49,50,63–65) Durch die Verwendung des Cre/loxP Rekombinationssystems wird es möglich, eventuelle beeinflussende „Störfaktoren“, die durch eine umfassend gestörte Embryonalentwicklung entstehen können (52), weitgehend auszuschließen. Die Apoptose innerhalb der Retina der transgenen Mäuse (α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl}) soll mit

Hilfe von TUNEL Analysen sichtbar gemacht und in Vergleich zu den Wildtypen (TGF- $\beta^{+/+}$) gesetzt werden. Anhand von Semidünnschnitten werden die Phänotypen verglichen, zusätzlich werden Dickenmessungen der Retina und Zellzählungen innerhalb der embryonalen Netzhaut durchgeführt. Um die Zellproliferationsrate zwischen Knockout und Wildtyp vergleichen zu können, werden BrdU-Färbungen durchgeführt.

1.8.2. α -Cre;Smad7^{fl/fl} Mäuse

Von α -Cre;Smad7^{fl/fl} Mäusen werden gegenteilige Ergebnisse zu denen von α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} erwartet, nämlich eine verstärkte Wirkung des TGF- β Signalwegs, da Smad 7 diesen im Sinne eines negativen Feedbacks hemmt. Das α -Cre;Smad7 Mausmodell dient folglich als positive Kontrolle der Ergebnisse durch die α -Cre;TGF- β -R2 Tiere. Zum Zwecke der Untersuchung dessen werden α -Cre Mäuse mit Smad 7-Gen-„geflochten“ Mäusen verpaart, um trächtige Muttertiere zu erhalten, deren Embryonen die zelltypspezifische Deletion von Smad 7 in den retinalen Neuronen tragen. Die Phänotypen sowie die Apoptoserate innerhalb der embryonalen Retina sollen anhand von Semidünnschnitten und TUNEL-Analysen zwischen Wildtypen (Smad7^{+/+}) und transgenen Tieren (α -Cre;Smad7^{fl/fl}) verglichen werden.

II. Material und Methoden

II.1. Materialliste

II.1.1. Reagenzienliste

100bp Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler™	
10x NH ₄ Reaction Puffer Bioline	Bioline GmbH, Luckenwalde
10x Q-Puffer	Eigenproduktion
1x PBS	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (10mM)	Qiagen, Hilden
H ₂ O Rotisolv (Rnase-frei)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
HCl (1N)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
MgCl ₂ (25mM)	Qiagen, Hilden
NaCl (0,85%)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Paraffin Paraplast Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
PFA (4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris/HCl	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Xylol	Merck KgaA, Darmstadt

Tabelle 1: Reagenzienliste

II.1.2. Enzyme und Kits

II.1.2.1. Enzyme

BioTaq™ DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde
Proteinase K	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe

Taq Polymerase

Eigenproduktion

Tabelle 2: Enzyme**II.1.2.2. Kits**

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System Promega, Madison, Wisconsin, USA

Tabelle 3: Kits**II.1.3. Verbrauchsmaterialien und Geräte****II.1.3.1. Verbrauchsmaterialien**

“Falcon” Reaktionsgefäße 15ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser, 18x18mm	Menzel – Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 24x40mm	Menzel – Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 24x50mm	Menzel – Gläser, Braunschweig
Einmalspritze 1 ml	Henry Schein Inc., Melville, New York, USA
Glaswaren	Schott AG, Mainz/ Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe/ VWR International GmbH, Darmstadt
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München
Multi-Reaktionsgefäße 0,2ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten	VWR International GmbH, Darmstadt
Personna Rasierklingen	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, England
Pipettenspitzen 20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
rotiprotect Latex Handschuhe	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

II.1.3.2. Geräte

Elektrophorese Netzgerät E835	Consort, Turnhout, Belgien
Gewebeeinbettungsautomat Leica EM TP	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Gewebeinfiltrationsautomat Microm HMP 110	Microm International, Walldorf
IDA Gel Documentation System	raytest GmbH, Straubenhardt
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Kern Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Mastercycler gradient/ -personal	Eppendorf, Hamburg
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Mikropipetten "pipetman"	Gilson Inc., Middleton, USA
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Göttingen
Mikrotom Reichert Jung Supercut 2050	Cambridge Instruments GmbH, Nussloch
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Paraffin Ausgießstation MPS/P2	SLEE Medical GmbH, Mainz
PerfectBlue Gelsystem Mini L	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Ultramikrotom Reichert Jung Ultracut E	Cambridge Instruments GmbH, Nussloch
UV-Vis Spectrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 5: Geräte**II.1.4. Gele, Puffer und Lösungen****II.1.4.1. Agarosegel**

Zur Auftrennung der bei den Genotypisierungs-PCRs entstandenen DNA wurden 1%ige Agarosegele hergestellt. Dazu wurden zunächst 100 µl 1x TBE-Puffer mit 1 g

Agarose vermischt, anschließend wurde dieses Gemisch für 3 min in der Mikrowelle erhitzt und nach Schwenken des Gefäßes nochmals für 1 min weitererhitzt. Nach Abkühlung wurden 3 µl Ethidumbromid hinzugegeben und das Gefäß wiederum geschwenkt, um im Folgenden das Gel in die vorgesehenen Schlitten zu gießen und die Kämme einzuhängen. Die Aushärtezeit betrug minimal 30 min.

II.1.4.2. Puffer und Lösungen

	Herstellung
0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4	100 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ mit 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf pH 7,4 auf 0,1 M mit dH_2O verdünnen
0,85% NaCl	0,85 % (w/v) in dH_2O , autoklavieren
1x TBE-Puffer	9 l H_2O bidest. 1 l 10x TBE-Puffer
5% Blotto	Sucofin Magermilchpulver in 0,1 M Phosphatpuffer
6x Orange Loading Dye	7,5 g Ficoll400 wenig Orange G dye auf 50 ml auffüllen mit dH_2O
10x TBE-Puffer	108 g Tris-Puffer 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8
BrdU-Lösung	5-Brom-2'-desoxyuridin in PBS-Puffer (10 mg/ ml)
Epon-Stammlösung	45 g Glycid Ether 30 g DDSA Härter 20 g MNA Härter 1,5 g DMP-30 Beschleuniger
Mausschwanzlyse-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM MgCl_2

	0,1 mg/ml Gelatine
	0,45 % Nonidet P-40
	0,45 % Tween 20
PBS, 10x, pH 7,4	80 g Natriumchlorid
	2 g Kaliumchlorid
	14,4 g Na ₂ H ₂ PO ₄
	2,4 g KH ₂ PO ₄
	mit dH ₂ O ad 1 l, autoklavieren
PFA-Lösung (4%)	4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4
Richardson Färbelösung	1% Azur II 1% Methylenblau dH ₂ O
Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,3 - 7,4	24 g Tris in dH ₂ O lösen; pH einstellen mit HCl; auf 0,05 M verdünnen mit dH ₂ O

Tabelle 6: Puffer und Lösungen**II.1.5. Antikörper**

Protein	PrimärAK	Bezugsquelle
BrdU	mouse IgG ₁ monoclonal PRB-1 α BrdU (0,2 mg/ml in PBS pH7,2 5 mM azide)	Invitrogen, Carlsbad, California, USA

Tabelle 7: Primärantikörper

SekundärAK	Bezugsquelle
Streptavidin Alexa 555	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
α M+B	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

Tabelle 8: Sekundärantikörper

II.1.6. Oligonukleotidprimer für Genotypisierungs-PCRs

Primer	Spezies	Sequenz	Produktgröße
α -Cre fwd	mm	5'-atgcttctgtccgtttgccg-3'	270bp
α -Cre rev	mm	5'-cctgttttgacgttcacg-3'	270bp
Smad7 fwd	mm	5'-gtcaggttgatcacatgcc-3'	568bp
Smad7 rev	mm	5'-actgcctggagaagtgtgtcg-3'	568bp
TGF- β -R2 fwd	mm	5'-gcaggcatcaggaccagttgatcc-3'	711bp
TGF- β -R2 rev	mm	5'-agagtgaagccgtgtaggtgagcttg-3'	711bp

Tabelle 9: Genotypisierungsprimer

II.2. Versuchstiere und Tierhaltung

Die folgenden drei verschiedenen Mauslinien kamen für die *in vivo* Experimente zum Einsatz:

- α -Cre Mäuse in FVB-N Hintergrund (24)
- TGF- β -R2^{fl/fl} Mäuse in Black6 Hintergrund (61)
[Arbeitsgruppe Hall Moses, Vanderbilt University, Tennessee]
- Smad7^{fl/fl} Mäuse in Black6 Hintergrund (62)
[Arbeitsgruppe Ingo Kleiter/ Andreas Steinbrecher, Neurologische Klinik der Universität Regensburg]

Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Bedingungen (Temperatur 23°C \pm 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% \pm 5%, Futter und Wasser ad lib.) alle in demselben Raum bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

Am Morgen nach der gezielten abendlichen Verpaarung wurde eine visuelle Plaque-Kontrolle der weiblichen Versuchstiere durchgeführt, die Tiere wurden anschließend wieder voneinander getrennt gesetzt. Dieser Zeitpunkt wurde als Embryonaltag E0.5 angenommen. Zu den unterschiedlichen Versuchszeitpunkten (E12.5, E14.5, E16.5) wurden morgens -möglichst zur gleichen Uhrzeit- die schwangeren Muttertiere unter einer Inhalationsnarkose mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet, im

Anschluss wurden ohne Zeitverzug die Embryonen dem Uterus entnommen und deren Kopf abpräpariert.

II.3. Molekularbiologische Methoden

II.3.1. Isolierung von DNA aus Mausschwanzbiopsien und embryonalem Gewebe

Für den Einsatz in der PCR wurde genomische DNA durch eine vereinfachte Methode (66) aus Mausschwanzbiopsien beziehungsweise embryonalem Mausgewebe gewonnen. Die etwa 5 mm lange Biopsie des Mausschwanzes bzw. der etwa hälftige embryonale Mäusekörper (ausgenommen der Kopf) wurde dazu in ein Gemisch von 190 µl Mausschwanzlysepuffer und 10 µl Proteinase K überführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation ü.N. bei 55°C im Thermomixer unter starkem Schütteln (1200 rpm). Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte am darauf folgenden Tag für 15 min bei 95°C ebenfalls im Thermomixer unter Schütteln. Die Proben wurden dann bei maximaler Geschwindigkeit (1400 rpm) für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nach Verdünnung in die PCR eingesetzt.

II.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mithilfe des UV-Vis Spectrophotometers NanoDrop 2000c (Firma Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) ermittelt. Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum für einzel- und doppelsträngige DNA. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von gelösten Proteinen. Anhand des Verhältnisses (Ratio) A₂₆₀/280 wurde die Güte der DNA beurteilt. Bei einer Ratio $\geq 1,8$ wurde eine ausreichende Reinheit der Nukleinsäuren angenommen. Nach dem Ergebnis der Photometrie wurden die Proben verdünnt und jeweils etwa 20 ng/ µl DNA in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

II.3.3. Genotypisierung der Versuchstiere

II.3.3.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifizierung eines DNA-Abschnitts in spezifischer Größe und Sequenz, um diesen anschließend nachweisen, untersuchen oder weiterverwenden zu können. Die als Vorlage dienende DNA wird dazu zunächst bei hoher Temperatur denaturiert. Beim Abkühlen auf die Annealingtemperatur können dann, zur Vorlage komplementäre, Primer (Oligonukleotide), welche einen bestimmten DNA-Abschnitt flankieren, an die denaturierte DNA binden. Anschließend dienen die gebundenen Primer als Ausgangspunkt zur Synthese eines komplementären DNA-Einzelstranges durch eine hitzestabile Taq-Polymerase. Dieser Prozess wird zwanzig- bis fünfunddreißigmal wiederholt und führt zu exponentiellem Kettenwachstum. (67,68)

II.3.3.2. Cre-Rekombinase

Mit Hilfe der PCR gelang die Unterscheidung in transgene Tiere und Wildtypen durch indirekten Nachweis der Cre-Rekombinase. Nach Isolierung der DNA (s. II.3.1.) und photometrischer Vermessung (s. II.3.2.) kamen etwa 40 ng in der PCR zum Einsatz.

Mastermix Cre	Gesamtvolumen 25µl
10x Q-Puffer	2,5µl
α-Cre Primer fwd	0,5µl
α-Cre Primer rev	0,5µl
dNTPs (10mM)	0,5µl
MgCl ₂ (25mM)	0,7µl
H ₂ O	17,8µl
Taq (Eigenproduktion)	0,5µl
DNA (verdünnt)	2,0µl

Tabelle 10: Mastermix Cre-PCR für einen Ansatz

Die Proben wurden gevortext, abzentrifugiert und unter folgendem Temperaturprotokoll der Genotypisierungs-PCR im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg) zugeführt:

	Schritt	Temperatur	Zeit	
1	Denaturierung	96°C	2 min	
2	Denaturierung	94°C	30 sec	} 29 Wdh.
3	Annealing	59°C	30 sec	
4	Extension	72°C	1 min	
5	Extension	72°C	2 min	
6	Aufbewahrung	10°C	∞	

Tabelle 11: PCR-Programm Cre

Die amplifizierte DNA wurde anschließend in der Gelelektrophorese (s. II.3.3.5.) aufgetrennt und sichtbar gemacht.

Das das transgene Tier kennzeichnende Produkt hatte eine Länge von 270 bp, beim Wildtyp trat auf dieser Höhe keine Bande auf.

II.3.3.3. TGF- β -R2

Die TGF- β -R2 PCR diente der Verifizierung, dass auf beiden Allelen der Versuchstiere das Gen für den TGF- β -R2 mit floxP-Sites flankiert ist.

Das Vorgehen sowie die verwendeten Geräte entsprachen denen bei der Cre-PCR (s.II.3.3.2.). Im Folgenden werden die Zusammensetzung des Mastermixes und das Temperaturprotokoll für die Genotypisierungs-PCR aufgeführt.

Mastermix TGF-β-R2	Gesamtvolumen 25μl
10x Puffer Bioline	2,5 μ l
TGF- β -R2 Primer fwd	0,5 μ l
TGF- β -R2 Primer rev	0,5 μ l
dNTPs (10mM)	0,5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1,2 μ l

H ₂ O	17,5µl
Taq (Bioline)	0,3µl
DNA (verdünnt)	2,0µl

Tabelle 12: Mastermix TGF-β-R2 PCR für einen Ansatz

	Schritt	Temperatur	Zeit	
1	Denaturierung	95°C	3 min	
2	Denaturierung	95°C	30 sec	} 35 Wdh.
3	Annealing	61°C	45 sec	
4	Extension	72°C	1 min	
5	Extension	72°C	5 min	
6	Aufbewahrung	10°C	∞	

Tabelle 13: PCR-Programm TGF-β-R2

Die amplifizierte DNA wurde anschließend in der Gelelektrophorese (s. II.3.3.5.) aufgetrennt und sichtbar gemacht. Ein homozygoter Knockout wurde durch das Auftreten einer Einzelbande auf der Höhe von 711 bp bestätigt.

II.3.3.4. Smad7

Bei der Smad7 Genotypisierungs-PCR galt es ebenso wie bei der von TGF-β-R2 den Nachweis für die Flankierung des Smad 7-Gens mit floxP-Sites sicher zu stellen.

Das Vorgehen sowie die verwendeten Geräte entsprachen denen bei der Cre-PCR (s.II.3.3.2.). Im Folgenden werden die Zusammensetzung des Mastermixes und das Temperaturprotokoll für die Genotypisierungs-PCR aufgeführt.

Mastermix Smad7	Gesamtvolumen 25µl
10x Puffer Bioline	2,5µl
Smad7 Primer fwd	0,5µl
Smad7 Primer rev	0,5µl
dNTPs (10mM)	0,5µl
MgCl ₂ (25mM)	1,2µl

H ₂ O	17,5µl
Taq (Bioline)	0,3µl
DNA (verdünnt)	2,0µl

Tabelle 14: Mastermix Smad7 PCR für einen Ansatz

	Schritt	Temperatur	Zeit	
1	Denaturierung	95°C	3 min	
2	Denaturierung	95°C	30 sec	} 35 Wdh.
3	Annealing	61°C	45 sec	
4	Extension	72°C	1 min	
5	Extension	72°C	5min	
6	Aufbewahrung	10°C	∞	

Tabelle 15: PCR-Programm Smad7

Die amplifizierte DNA wurde anschließend in der Gelelektrophorese (s. II.3.3.5.) aufgetrennt und sichtbar gemacht. Ein homozygoter Knockout wurde durch das Auftreten einer Einzelbande auf der Höhe von 568 bp bestätigt.

Zum Zwecke der Fehlerminimierung wurde bei allen PCRs sowohl eine Negativkontrolle (23 µl Mastermix mit 2 µl H₂O) zum Ausschluss etwaiger Verunreinigungen als auch eine Positivkontrolle zur Erfolgsbestätigung mitgeführt.

II.3.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Nach erfolgter PCR wurden die Proben mit 3,5 µl 6x Orange Loadind Dye versetzt, gevortext, zentrifugiert und anschließend auf ein vorbereitetes, 1,0%iges Agarosegel zur Auftrennung der DNA aufgebracht. Als Laufpuffer in den Flachbettkammern wurde 1x TBE Puffer verwendet. Als Größenstandard diente ein 100 bp Ladder (New England Biolabs, Frankfurt am Main). Alle Agarose-Gelelektrophoresen wurden unter den Bedingungen 500 mA, 125 V, 150 W, 45 min ausgeführt.

Die Gele wurden im Folgenden mit Hilfe des IDA Gel Documentation Systems (raytest GmbH, Straubenhardt) fotografiert.

II.4. Histologische Techniken

II.4.1. Einbettung, Gewebeschnitte und Phänotypanalyse

II.4.1.1. Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

In der Vorbereitung zur Paraffineinbettung wurden die abpräparierten Embryonenköpfe für ca. 4 Stunden in 4% PFA-Lösung fixiert. Es erfolgte zweimalige Spülung mit 0,1 M Phosphatpuffer für 10 min, einmalige Spülung mit 50% Isopropanol für 1 Stunde und mit 70% Isopropanol für 30 - 45 min. Zur Aufbewahrung wurde der 70% Isopropanol erneut gewechselt. Die Embryonenköpfe wurden anschließend unter dem Mikroskop in der Mitsagittalebene halbiert, mit einer Rasierklinge grob auf ein begrenztes Areal um die Orbita zugeschnitten und oberhalb des Auges, zum Zwecke der erleichterten Einbettung, minuciert.

Die Paraffineinbettung der halben Embryonenköpfe selbst geschah in einem Gewebeinfiltrationsautomaten HMP 110 (Microm International, Walldorf). Im Folgenden ist der Programmablauf dargestellt.

	Reagenz	Zeit
1	70% Isopropanol	1 h
2	80% Isopropanol	1 h
3	96% Isopropanol I	1 h
4	96% Isopropanol II	2 h
5	100% Isopropanol I	1 h
6	100% Isopropanol II	1 h
7	100% Isopropanol III	2 h
8	Xylol I	1 h
9	Xylol II	1,5 h
10	Paraffin I	2 h
11	Paraffin II	8 h

Tabelle 16: Einbettprogramm Paraffin

Nach Programmablauf wurden die Präparate mit einer Paraffin-Ausgießstation MPS/P2 ausgebettet (SLEE Medical, Mainz) und in vorgesehene Halter eingebracht. Die Paraffinschnitte erfolgten an einem Microtom Reichert Jung Supercut 2050 (Cambridge Instruments, Nussloch). Nach Überführung in ein temperiertes Wasserbad wurden sie auf Objektträger aufgenommen. Es wurde bei der Ausführung der Schnitte der Fokus auf die Orbitaregion gelegt und darauf geachtet, dass der Schnitt sagittal durch das Auge, mit Abbildung der Papille sowie geöffneter Linse, führte.

II.4.1.2. Eponeinbettung, Anfertigung von Semidünnschnitten und Phänotypanalyse

Die halben Embryonenköpfe wurden in einer Mischung aus Formaldehyd (2,5%), Glutaraldehyd (2,5%), Caco-Puffer (0,2 M; pH 7,6) und H₂O bidest. über mehrere Stunden fixiert und anschließend mehrfach mit Caco-Puffer gespült.

Die Köpfe wurden dann in 1% Osmiumferrocyanid 3,5 Stunden bei 4°C nachfixiert, das Osmium über neun Schritte mit H₂O bidest. bei 10°C ausgewaschen und die Köpfe dann stufenweise der Entwässerung durch diese aufsteigende Alkoholreihe unterzogen:

Schritt	Reagenz	Temperatur	Durchführung	Zeit
1, 2	25% Ethanol	15°C	2x	15 min
3, 4	35% Ethanol	15°C	2x	15 min
5, 6	50% Ethanol	15°C	2x	15 min
7, 8	60% Ethanol	20°C	2x	15 min
9	70% Ethanol I	20°C		60 min
10	70% Ethanol II	20°C		75 min
11	70% Ethanol III	20°C		10 min
12, 13	80% Ethanol	20°C	2x	40 min
14, 15, 16	90% Ethanol	20°C	3x	40 min
17	100% Ethanol I	20°C		20 min
18	100% Ethanol II	20°C		40 min

19	100% Ethanol III	20°C	60 min
----	------------------	------	--------

Tabelle 17: Entwässerung zur Eponeinbettung

Schließlich erfolgte die Eponeinbettung, wie auch die vorigen Schritte, in dem Gewebeeinbettungsautomat Leica EM TP (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) nach Standardmethoden:

Schritt	Reagenz	Verhältnis	Durchführung	Zeit
1,2	Prophylenoxid		2x	20 min
3	Prophylenoxid / Epon	2:1		120 min
4	Prophylenoxid / Epon	1:1		120 min
5	Prophylenoxid / Epon	1:2		120 min
6	Epon			ü.N.

Tabelle 18: Eponeinbettung

Es folgte die Aushärtung im Brutschrank bei 60°C für 24 Stunden.

Von den halbierten Embryonenköpfen wurden mit einem Reichert Jung Ultracut E Mikrotom (Cambridge Instruments GmbH, Nussloch) Semidünnschnitte angefertigt. Auch hierbei wurde, wie schon bei der Anfertigung der Paraffinschnitte, der Fokus auf die Orbitaregion gelegt und darauf geachtet, dass das embryonale Auge in sagittaler Richtung, mit Abbildung der Papille und offener Linse, geschnitten wurde. Die Semidünnschnitte der Augen wurden nach Richardson (69) gefärbt. Betrachtet und aufgenommen wurden die Schnitte anschließend mit dem Lichtmikroskop Axio Imager Z1 (Zeiss, Göttingen).

Im Zuge der Phänotypanalyse wurde zum einen die Dicke der Retina in 10% - Schritten entlang des Gesamtretinaumfangs mit Hilfe des Bildbearbeitungs- und Analysesystems Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen) gemessen, zum anderen wurde eine quantitative Analyse der Zellkerne der Retinavorläuferzellschichten, d.h. der Ventrikulär- und Marginalzone der Retina durchgeführt. Dazu wurden zunächst, ebenfalls im Bildbearbeitungs- und Analysesystems Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen), vier Bereiche festgelegt, innerhalb derer in einem zweiten Schritt mit der Zählsoftware katikati2 die Zellkerne ausgezählt wurden. Die jeweils 150 µm großen

Bereiche wurden mit einem Abstand von 100 µm vom Nervus opticus für die zentrale Retina beziehungsweise 200 µm von der Ora serrata für die periphere Retina gewählt.

II.4.2. Immunhistologische Methoden

II.4.2.1. TUNEL-Reaktion

Zur Detektion und Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System verwendet. Durch das Enzym Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) werden dabei freiwerdende nukleäre DNA-Fragmente, die ein wichtiges biochemisches Kennzeichen der Apoptose darstellen, an ihren 3'-OH Enden mit Fluorescein-12-dUTP (Fluorescein-6-Carboxyaminocaproyl-[5-(3-aminoallyl)-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat]), einem Desoxyribonukleosidtriphosphat, versehen. Die so markierte DNA kann dann unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden (70).

In Vorbereitung der Reaktion müssen die Paraffinschnitte zunächst der Entparaffinierung unterzogen werden:

	Reagenz	Zeit
1	Xylol I	10 min
2	Xylol II	10 min
3	100% Isopropanol I	10 min
4	100% Isopropanol II	10 min
5	96% Isopropanol	5 min
6	96% Isopropanol	5 min
7	80% Isopropanol	5 min
8	80% Isopropanol	5 min
9	70% Isopropanol	5 min
10	50% Isopropanol	5 min

Tabelle 19: Abfolge der Entparaffinierung

Nach kurzer Spülung in H₂O bidest. werden die Schnitte folgendermaßen weiterbehandelt:

Schritt	Reagenz	Durchführung	Zeit
1	0,89% NaCl		5 min
2, 3	1x PBS	2x	5 min
4	4% PFA		15 min
5, 6	1x PBS	2x	5 min
7	Proteinase K (1:500 in 1x PBS)		8 min
8, 9	1x PBS	2x	5 min
10	4% PFA		5 min
11, 12	1x PBS	2x	5 min
13	Equilibration buffer		10 min
14	rTdT-Inkubation bei 37°C (22,5 µl Equilibration buffer + 2,5 µl Nukleotide Mix + 0,5 µl rTdT pro Schnitt)		60 min
15	2x SSC		15 min
16, 17	1x PBS	2x	5 min

Tabelle 20: TUNEL-Reaktion

Die Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1, Zeiss, Göttingen) betrachtet und Bilder in den Farbkanälen GFP und DAPI aufgenommen. Diese wurden in dem Bildbearbeitungs- und Analysesystem Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen) zu einem Bild zusammen geführt. Die TUNEL-positiven Zellen wurden mit Hilfe der Software katikati2 gezählt und ins Verhältnis gesetzt zur Fläche der Retina (in mm²), welche wiederum in dem Bildbearbeitungs- und Analysesystem Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen) berechnet wurde.

II.4.2.2. BrdU-Färbung

Zur Bestimmung der Zellproliferationsrate wurde die BrdU-Färbung herangezogen. BrdU (Bromdesoxyuridin) wird in die Zelle aufgenommen und während des Zellzyklus

in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Zu diesem Zwecke wurden schwangeren Weibchen zwei Stunden vor der Tötung intraperitoneal 200 µl 5-Brom-2'-desoxyuridin (10 mg/ ml in PBS-Puffer) injiziert. Zum anschließenden Nachweis werden spezifische Antikörper gegen BrdU eingesetzt, welche fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren sind.

Zunächst mussten die Paraffinschnitte entparaffiniert werden. (s. Tabelle 19)

Dann erfolgte eine kurze Spülung in H₂O bidest. Und folgende Weiterbehandlung:

Schritt		Reagenz	Durchführung	Zeit
1	0,05 M	Tris-HCl		5 min
2		Proteinase K (100 µl Proteinase K + 57 ml 0,05 M Tris-HCl)		5 min
3		H ₂ O bidest.		kurz
4	1 N	HCl		30 min
5		H ₂ O bidest.		kurz
6	0,1 M	Phosphatpuffer		5 min
7	5%	Blotto		45 min
8		AK I, αBrdU bei 4°C (1:50 in 0,5% Blotto)		ü.N.
9, 10, 11	0,1 M	Phosphatpuffer	3x	5 min
12		AK II, αM+B (1:500 in 0,5% Blotto)		1 h
13, 14, 15	0,1 M	Phosphatpuffer	3x	5 min
16		AK III, Streptavidin Alexa 555 (1:1000 in 0,5% Blotto)		1 h
17, 18, 19	0,1 M	Phosphatpuffer	3x	5 min

Tabelle 21: BrdU-Färbung

II.4.3. Eindeckeln von Gewebeschnitten

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle immunhistologischen Gewebeschnitte zur Fluoreszenzmikroskopie mit 1:10 DAPI eingedeckelt.

II.5. Auswertung und Statistik

Die Auswertung der numerischen Daten und deren graphische Darstellung erfolgte mittels der Software Microsoft® Excel (Microsoft® Corporation, Redmond, USA).

Für die statistische Analyse der Versuche wurde der „Student's“ T-Test herangezogen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für $p < 0,05$ und statistisch hoch signifikante Unterschiede für $p < 0,01$ angenommen. In den Diagrammen ist dieses durch * (für $p < 0,05$) bzw. ** (für $p < 0,01$) gekennzeichnet.

Für die Berechnung der Fehlerbalken wurde der Standardfehler (SEM) zugrunde gelegt.

III. Ergebnisse

III.1. Konditioneller Knockout des TGF- β -Rezeptors2

III.1.1. Nachweis des konditionellen Knockouts von TGF- β -R2 durch Western Blot Analyse

Zum Nachweis des konditionellen Knockouts von TGF- β -R2 wurde der von Pielmeier durchgeführte Western Blot (71) dieser Arbeit zugrunde gelegt (s. Abb.5). Er liefert den immunochemischen Nachweis des Knockouts der Versuchstiere auf Proteinebene.

Die auf der Höhe von 70 kDa nachgewiesene Bande ist spezifisch für TGF- β -R2. Sie erscheint bei gleich eingesetzter Proteinmenge (s. Ladungskontrolle GAPDH bei 34 kDa) beim transgenen α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tier schwächer als beim Wildtyp TGF- β -R2^{+/+} (vgl. Abb. 5a). Zusätzlich wurde ein Western Blot der intrazellulären Signalmoleküle pSmad 2 und pSmad 3 durchgeführt, welche beim Wildtyp TGF- β -R2^{+/+} als Banden in Höhe von 58 kDa (pSmad 2) beziehungsweise 52 kDa (pSmad 3) nachgewiesen werden konnten. Bei α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Mäusen hingegen wurde lediglich eine Bande für pSmad 2 detektiert. (71) (vgl. Abb. 5b)

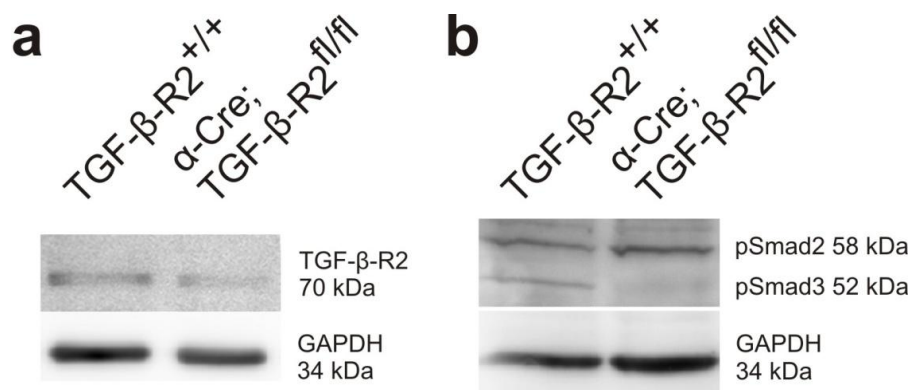


Abbildung 5: Western Blot Analyse von TGF- β -R2(a) bzw. pSmad 2/3 (b) zum Nachweis des konditionellen Knockouts von TGF- β -R2, durchgeführt von Pielmeier (71)

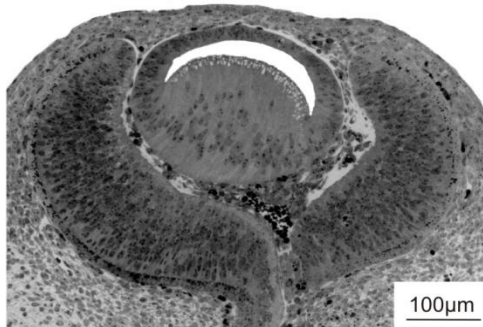
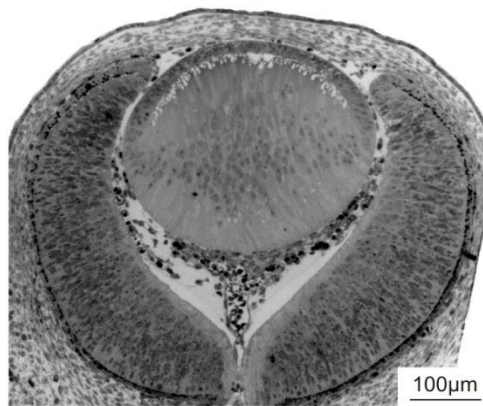
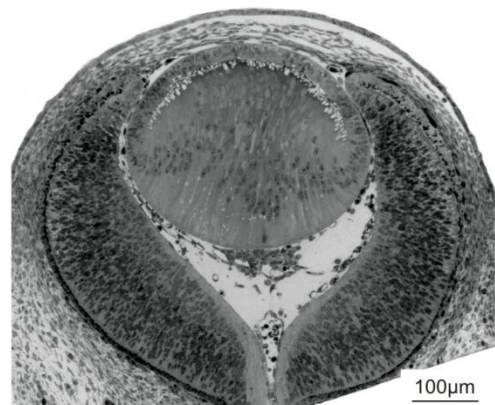
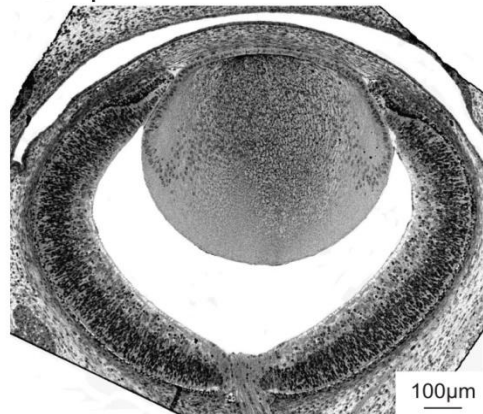
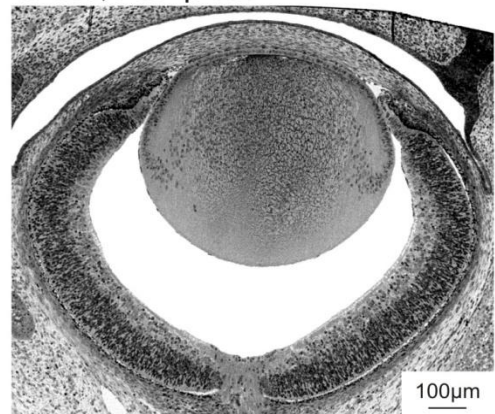
III.1.2. Phänotypanalyse der α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Mäuse

III.1.2.1. Morphologie

Morphologische Studien wurden anhand von Semidünnschnitten der embryonalen Augen zu verschiedenen Zeitpunkten (s. Abb. 6) durchgeführt.

Zu keinem der Zeitpunkte E12.5, E14.5 und E16.5 konnten bei visueller Betrachtung strukturelle oder entwicklungsbedingte Diskrepanzen zwischen TGF- β -R2^{+/+} und α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Mäusen festgestellt werden. Am Embryonaltag E12.5 ist am vorderen Pol der Linse das sich zurück bildende Linsenbläschen zu erkennen, der Bereich des späteren Glaskörpers ist mit Gefäßstrukturen, die der A. hyaloidea zugehörig sind, zur Versorgung der Linse gefüllt, das retinale Pigmentepithel erscheint bereits pigmentiert, das innere Blatt der Retina ist deutlich zu mehreren Zelllagen verdickt. An Tag E14.5 haben sich innerhalb der Linse die primären Linsenfasern weiter ausgebildet, die Kornea formiert sich zu einer verdickten, mehrlagigen Struktur, innerhalb der Retina lässt sich eine Ventrikulär- von einer Marginalzone unterscheiden, außerhalb des RPEs sind Kapillaren der Choroidea zu erkennen. Ebenfalls ist die Nervenzellschicht weiter gereift, ihre Axone vereinigen sich im Bereich der Papille zum N. opticus. Die Aufnahmen am Embryonaltag E16.5 zeigen eine deutliche Unterscheidung der Marginal- und Ventrikulärzone innerhalb der Retina, die Arteria hyaloidea hat sich zurück gebildet, im Bereich des Ziliarkörpers und der Iris sind Entwicklungsprozesse abzusehen und außerdem haben die Augenlieder fusioniert. Als äußere Begrenzung des Bulbus ist die Sklera zu sehen.

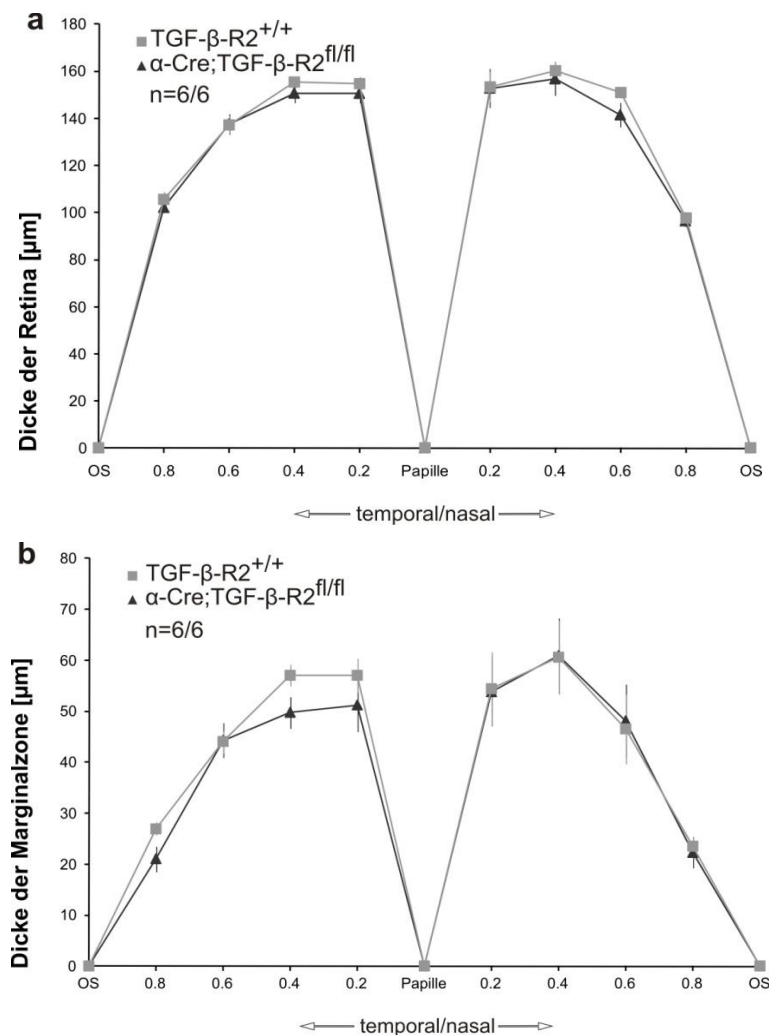
Im Sinne der Spezifizierung der Phänotypanalyse und zur etwaigen Detektion visuell nicht offensichtlicher morphologischer Unterschiede zwischen transgenen Tieren α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und Wildtypen TGF- β -R2^{+/+} wurden des weiteren Dickenmessungen der Retina sowie Zellzählungen innerhalb der Retina am Embryonaltag E16.5 durchgeführt (s. III.1.2.2. und III.1.2.3.).

a E12.5 TGF- β -R2^{+/+}**α-Cre;TGF-β-R2^{fl/fl}****b E14.5** TGF- β -R2^{+/+}**α-Cre;TGF-β-R2^{fl/fl}****c E16.5** TGF- β -R2^{+/+}**α-Cre;TGF-β-R2^{fl/fl}****Abbildung 6:** Phänotyp α-Cre;TGF-β-R2^{fl/fl}

Panoramaaufnahmen von Wildtyp und transgenem Tier im Vergleich in verschiedenen Embryonalstadien (a) E12.5 (b) E14.5 (c) E16.5, Vergrößerung 10x

III.1.2.2. Dickenmessung der Retina

Zunächst wurden die Retinae von 16,5 Tage-alten Embryonen in ihrer Gesamtdicke im Verlauf von der temporalen Ora serrata über die Papille zur nasalen Ora serrata vermessen (s. Abb. 7a). Im Anschluss wurde die embryonale Retina in zwei erkennbare Zellschichten, zum einen die Marginalzone mit rundlichen Zellkörpern und hellem Zytoplasma und zum anderen die Ventrikulärzone mit länglichen Zellkörpern und dunklerem Zytoplasma, unterteilt und deren Dicke ebenfalls im Verlauf bestimmt (s. Abb. 7b, c). Zumeist lagen die Werte bei TGF- β -R2^{+/+} Mäusen gering höher als bei α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tieren, jedoch zeigte sich dabei an keiner Stelle der Retina ein signifikanter Unterschied zwischen transgenem Tier und Wildtyp (vgl. Abb. 7).



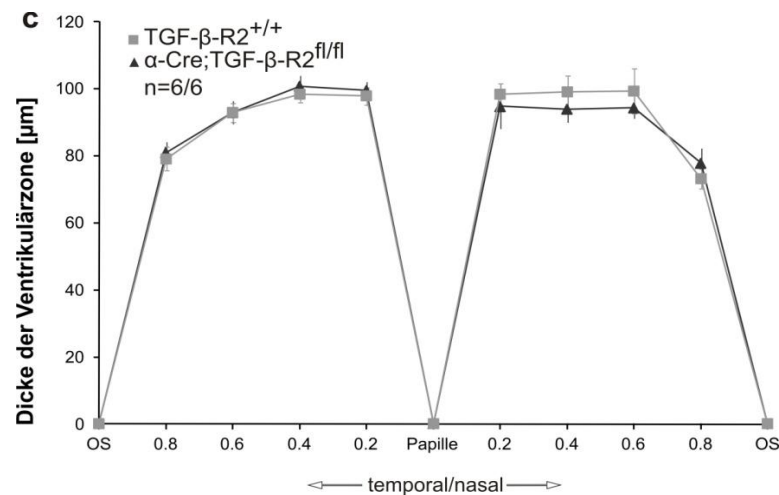


Abbildung 7: Retinadickenmessungen zum Zeitpunkt E16.5 bei α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} (a) Gesamtretinadicke (b) Dicke der Marginalzone der embryonalen Retina (c) Dicke der Ventrikulärzone der embryonalen Retina, relative Mittelwerte \pm SEM dargestellt

III.1.2.3. Zellzählung der Retina

Bei der Zellzählung wurde ebenfalls visuell zwischen Zellen der Marginal- und Ventrikulärzone innerhalb der embryonalen Retina unterschieden, zudem wurden die Auszählbereiche in temporal-nasaler sowie zentral-peripherer Orientierung differenziert ausgewertet. An keinem der erhobenen Datenpunkte konnte für die periphere Retina (s. Abb. 8a) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Für die zentrale Retina (s. Abb. 8b) stellten sich die Ergebnisse analog dar.

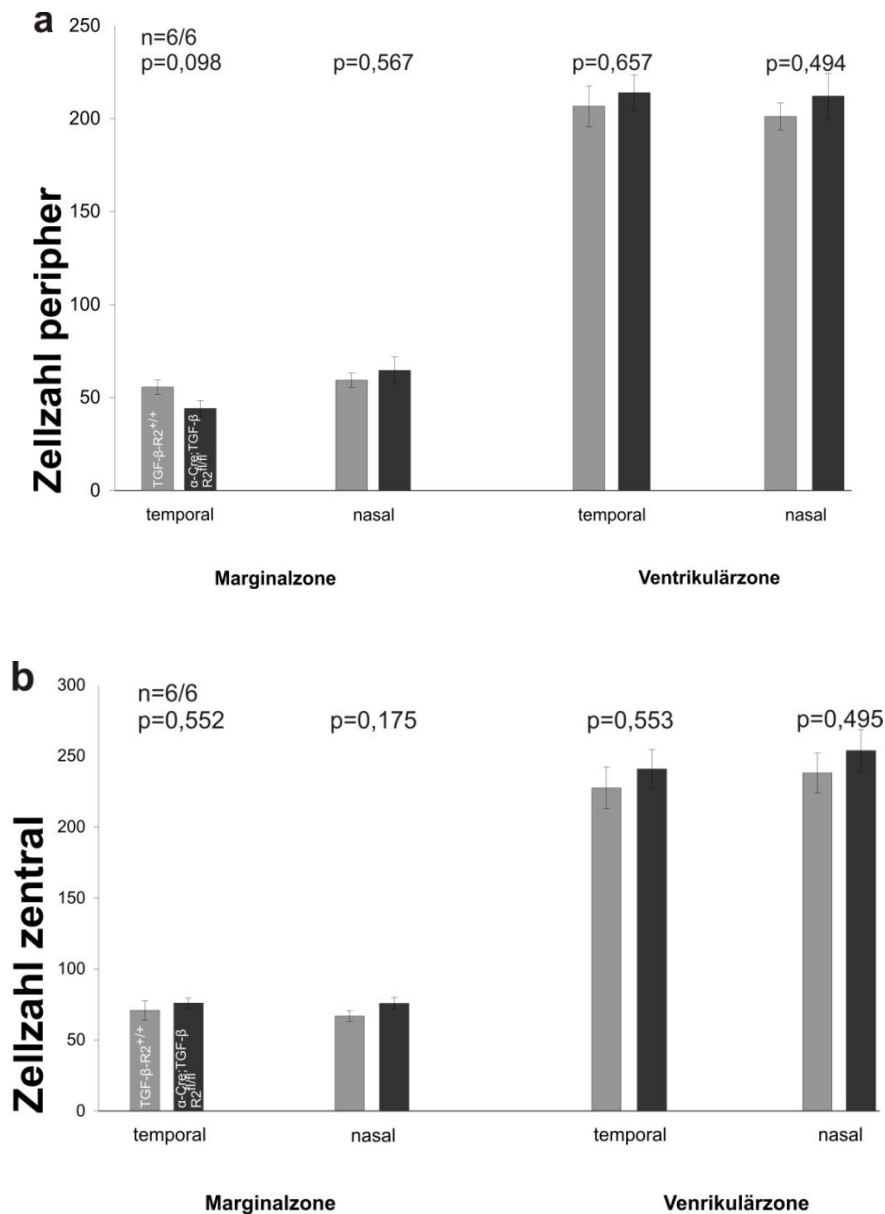


Abbildung 8: Zellzählung der Retina zum Zeitpunkt E16.5 bei α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} (a) peripherer Auswahlbereich der embryonalen Retina (b) zentraler Auswahlbereich der embryonalen Retina, relative Mittelwerte \pm SEM dargestellt

III.1.3. Detektion apoptotischer Zellen mittels der TUNEL-Reaktion

Die TUNEL-Reaktion wurde für die drei untersuchten Zeitpunkte E12.5, E14.5 und E16.5 durchgeführt. In allen Fällen wurden bei α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tieren im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Mäusen vermehrt TUNEL-positive Zellen detektiert. Die TUNEL-positiven Zellen erschienen dabei über die, entwicklungsbedingt noch nicht in einzelne Schichten differenzierbare, Retina relativ diffus verteilt (vgl. Abb. 9).

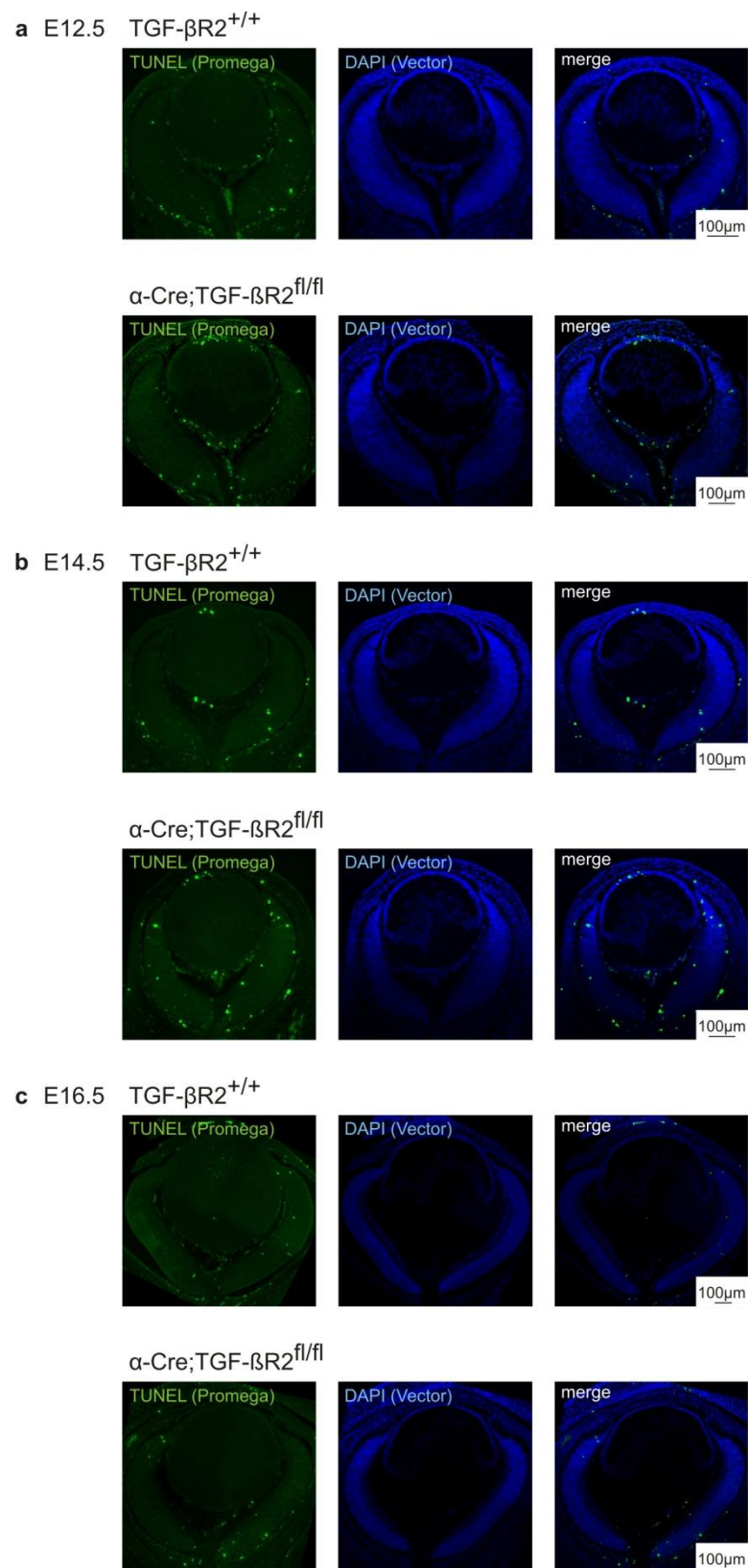


Abbildung 9: TUNEL-Reaktion bei α -Cre;TGF- β -R2^{-/-} und TGF- β -R2^{+/+}

Wildtyp und transgenes Tier im Vergleich in verschiedenen Embryonalstadien (a) E12.5 (b) E14.5 (c) E16.5, Vergrößerung 10x

Im Zuge der statistischen Analyse der TUNEL-Reaktion zeigte sich für alle untersuchten Zeitpunkte eine signifikant höhere Apoptoserate (korrelierend mit der Anzahl TUNEL-positiver Zellen) für α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Versuchstiere im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Mäusen; Embryonaltag E16.5 ist als hochsignifikant ($p=0,003$) zu bewerten. Die relative Apoptoserate sank dabei von 2,91 (E12.5) über 1,86 (E14.5) bis 1,45 (E16.5). (vgl. Abb. 10)

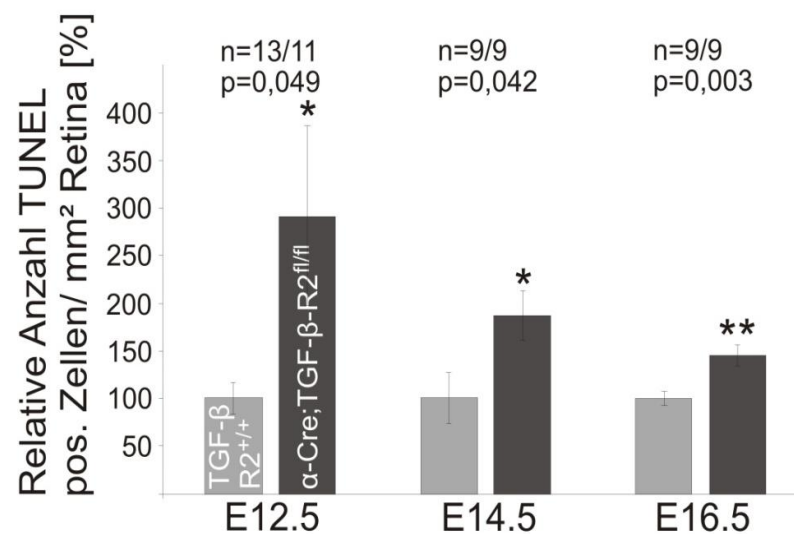


Abbildung 10: relative Anzahl TUNEL-positiver Zellen bezogen auf mm² Retina bei konditionellem Knockout von TGF- β -R2 am Embryonaltag E12.5, E14.5 und E16.5, relative Mittelwerte \pm SEM dargestellt

III.1.4. Bestimmung der Zellproliferationsrate mittels BrdU-Färbung

Die Zellproliferationsrate wurde am Embryonaltag E16.5 bei α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} Versuchstieren bestimmt. BrdU-positive Zellen konnten zahlreich innerhalb der Marginal- und Ventrikulärzone der embryonalen Retina in beiden Tiermodellen dargestellt werden (s. Abb. 11).

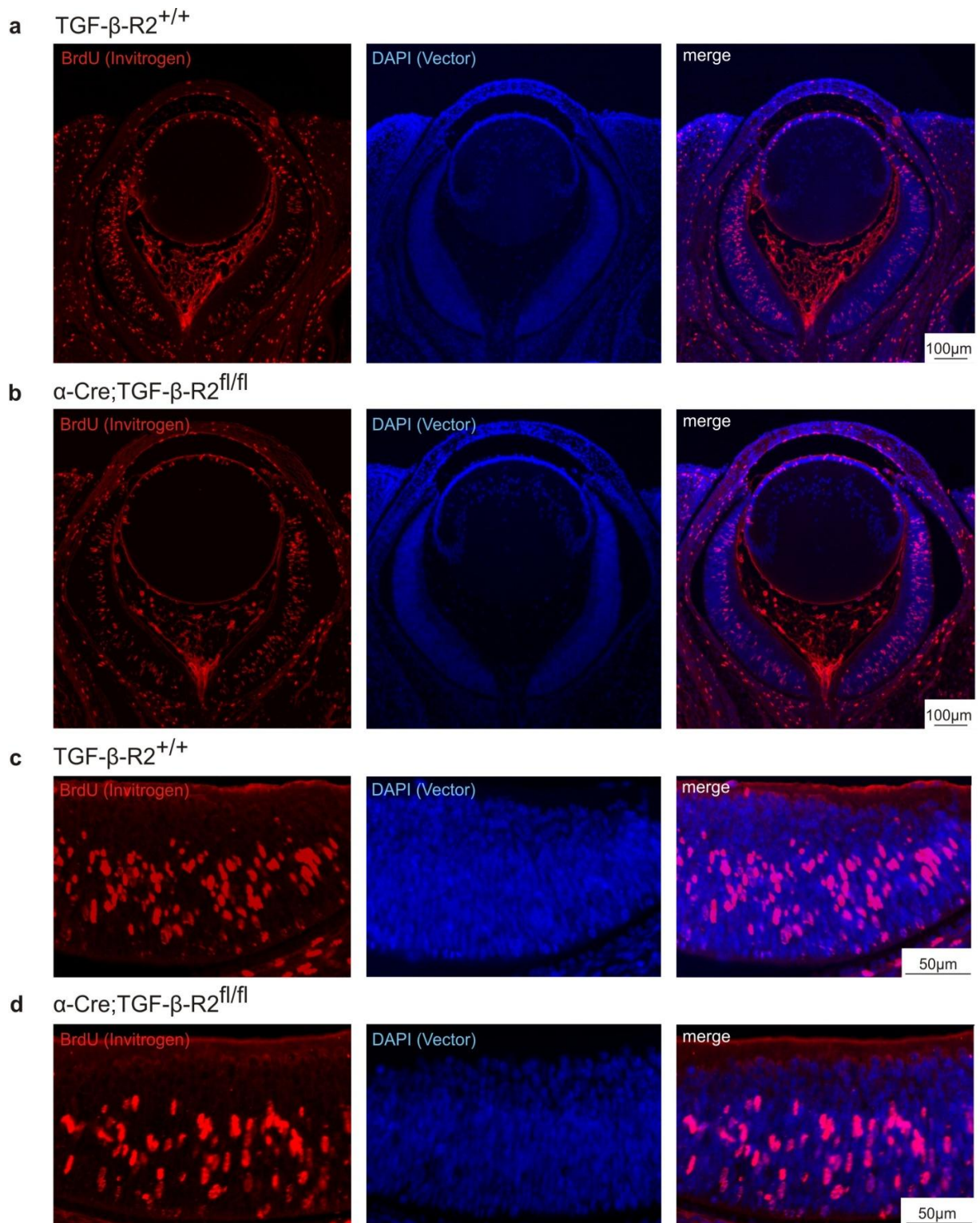


Abbildung 11: BrdU-Färbung bei konditionellem Knockout von TGF- β -R2

Übersichtsaufnahme (a, b) bei Wildtyp (a) und transgenem Tier (b), Vergrößerung 5x und Detailaufnahme (c,d) bei Wildtyp (c) und transgenem Tier (d), Vergrößerung 20x, alle am Embryonaltag E16.5

Die quantitative Auswertung zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen (s. Abb. 12).

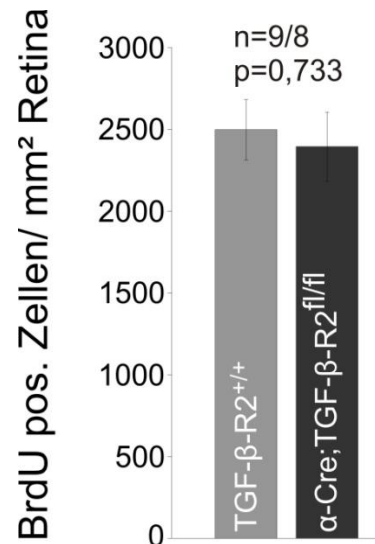


Abbildung 12: BrdU-positive Zellen bezogen auf mm² Retina bei Wildtyp und transgenem Tier am Embryonaltag 16.5, relative Mittelwerte \pm SEM dargestellt

III.2. Konditioneller Knockout von Smad 7

III.2.1. Nachweis des konditionellen Knockouts von Smad 7 durch Western Blot Analyse

Aufgrund der antagonistisch zu TGF- β zu erwarteten Wirkung von Smad 7 im TGF- β -Signalweg wurden vergleichbare Untersuchungen unter konditionellem Knockout von Smad 7 am Embryonaltag E16.5 durchgeführt.

Der immunochemische Knockout-Nachweis erfolgte wiederum auf der Grundlage eines Western Blots, welcher von Pielmeier durchgeführt wurde (s. Abb. 13). Auf der Höhe von 46 kDa konnte dabei eine für Smad 7 spezifische Bande bei Smad7^{+/+} Versuchstieren nachgewiesen werden, welche dagegen für α -Cre;Smad7^{fl/fl} Mäuse bei gleich eingesetzter Proteinmenge (s. Ladungskontrolle GAPDH bei 34 kDa) nur sehr schwach auftrat. Charakteristische Banden für Smad 6 auf der Höhe von 54 kDa stellten sich im Western Blot für beide Tiermodelle gleichermaßen dar. (71)

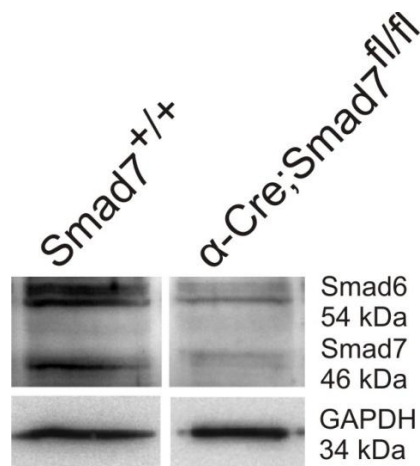


Abbildung 13: Western Blot Analyse von Smad 6 und Smad 7 zum Nachweis des konditionellen Knockouts von Smad 7, durchgeführt von Pielmeier (71)

III.2.2. Phänotypanalyse der α -Cre;Smad7^{fl/fl} Mäuse

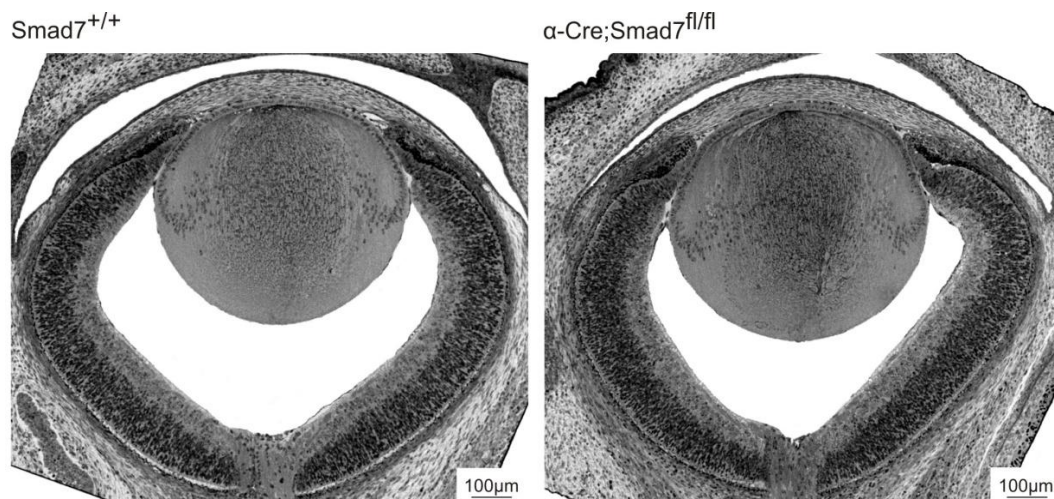


Abbildung 14: Phänotyp α -Cre;Smad7^{fl/fl}

Panoramaaufnahmen von Wildtyp und transgenem Tier im Embryonalstadium E16.5, Vergrößerung 5x

Analysen hinsichtlich der Morphologie wurden anhand von Semidünnschnitten der embryonalen Augen zum Zeitpunkt E16.5 vorgenommen. (s. Abb. 14)

Es konnten bei visueller Betrachtung keine strukturellen oder entwicklungsbedingten Unterschiede zwischen Smad7^{+/+} und α -Cre;Smad7^{fl/fl} Mäusen festgestellt werden. Die Schichtung der Retina erschien entwicklungsgerecht, ebenso die Bildung der Papillenregion und der Region um den sich entwickelnden Ziliarkörper.

III.2.3. Detektion apoptotischer Zellen mittels der TUNEL-Reaktion

Die TUNEL-Reaktion wurde ebenfalls exemplarisch für den Zeitpunkt E16.5 durchgeführt. Bei α -Cre;Smad7^{fl/fl} Tieren wurden im Vergleich zu Smad7^{+/+} Mäusen weniger TUNEL-positive Zellen detektiert. Die TUNEL-positiven Zellen erschienen dabei über die entwicklungsbedingt noch nicht in einzelne Schichten differenzierbare Retina relativ diffus verteilt (vgl. Abb. 15).

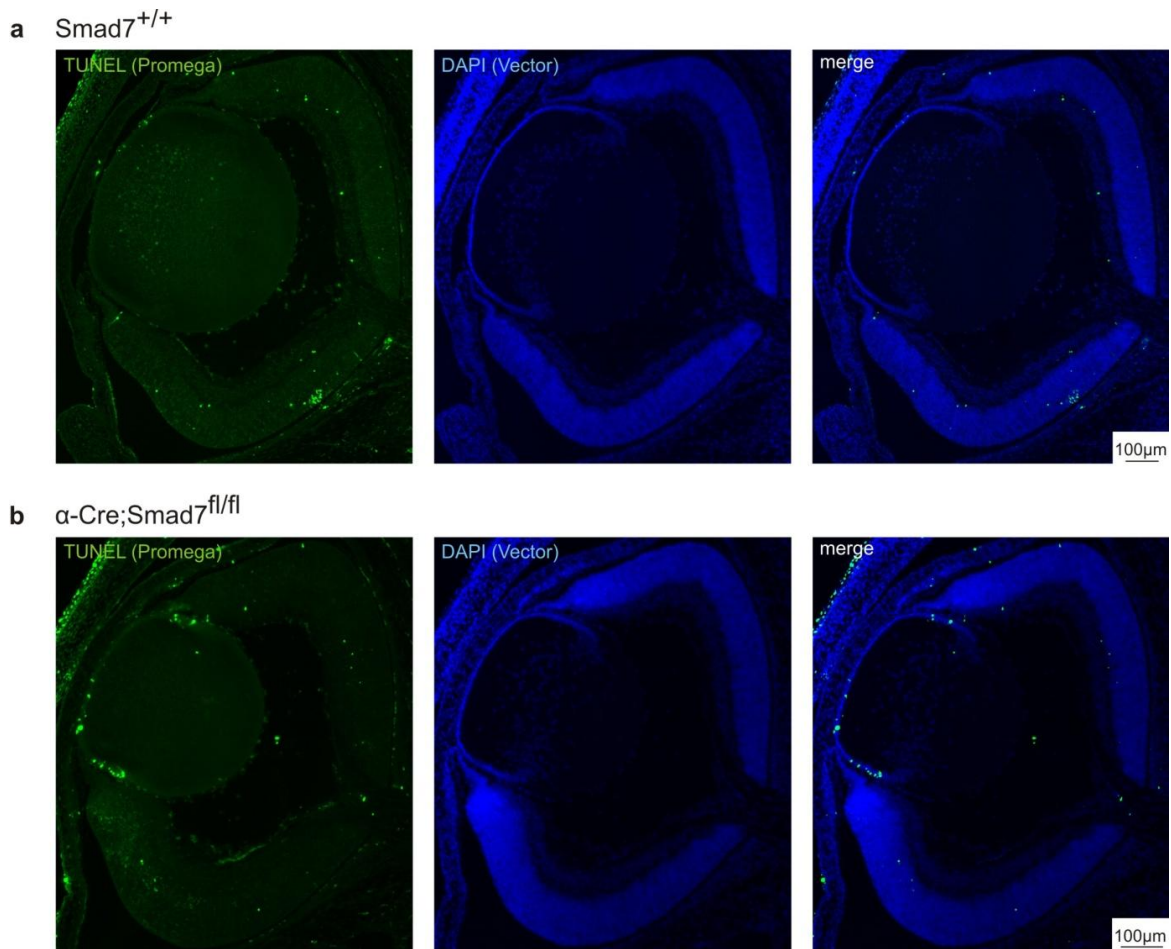


Abbildung 15: TUNEL-Reaktion bei konditionellem Knockout vom Smad 7
Wildtyp (a) und transgenes Tier (b) im Vergleich am Embryonaltag E16.5

Im Zuge der statistischen Analyse der TUNEL-Reaktion zeigte sich eine hoch signifikant ($p=0,003$) geringere Apoptoserate (korrelierend mit der Anzahl TUNEL-positiver Zellen) für α -Cre;Smad7^{fl/fl} Versuchstiere im Vergleich zu Smad7^{+/+} Mäusen. (vgl. Abb. 16)

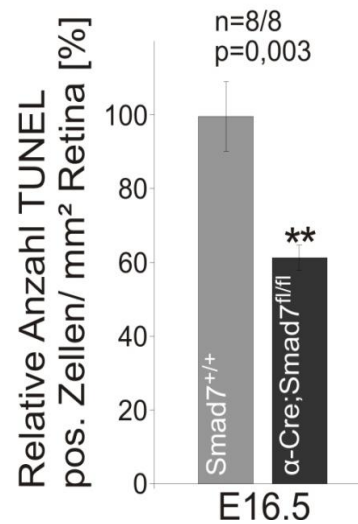


Abbildung 16: relative Anzahl TUNEL-positiver Zellen bezogen auf mm² Retina bei konditionellem Knockout von Smad 7 am Embryonaltag E16.5, relative Mittelwerte \pm SEM dargestellt

IV. Diskussion

IV.1. Konditioneller Knockout des TGF- β -Rezeptors2

Um das Zusammenwirken des TGF- β -Signalwegs und des Programmierten Zelltods in der Retina während der Embryonalentwicklung zu erforschen, wurden transgene Mäuse mit Hilfe des Cre/loxP Systems generiert, in denen zelltypspezifisch nur in Neuronen der Retina der TGF- β -Signalweg vollständig gehemmt wird.

Man schaffte es durch dieses Vorgehen, die frühe embryonale Letalität um Embryonaltag E10.5 von Mäusen unter konventionell systemischem Knockout des TGF- β -R2, die durch Defekte in der Hämatopoese und Gefäßentwicklung und daraus resultierender Dottersackinsuffizienz entsteht (52), zu umgehen. Im Gegensatz zu anderen, in der Vergangenheit durchgeführten, in vitro und in vivo Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern gegen die TGF- β -Isoformen (49,50), die erst nach der Geburt verabreicht werden können und unter Erhalt des eigentlichen Signalwegs, und somit möglicher Wirkung weiterer Agonisten bzw. Antagonisten an dessen Rezeptoren, zum Einsatz kommen, wurde hier ein in vivo Vorgehen unter kompletter Blockade des TGF- β -Signalwegs in den Neuronen der Retina ermöglicht.

Die zelltypspezifische Hemmung retinaler Neurone bringt aber auch mit sich, dass weitere, in der Retina vorkommende Zellen nach wie vor fähig sind, TGF- β -Rezeptoren zu exprimieren. Zu nennen sind Perizyten, Endothelzellen und Astrozyten, welche in ihrer Funktion möglicherweise wiederum eine Wirkung auf die Neurone ausüben. Das Vorkommen anderer Zellgruppen, durch deren Anwesenheit der TGF- β -Signalweg unter konditionellem TGF- β -R2 Knockout trotzdem – wenn auch stark reduziert – abläuft, ist auch als Erklärung dafür anzusehen, dass in den Western-Blot Analysen keine komplette „Nullantwort“ zu sehen ist (71). Der Western-Blot von pSmad 2 und 3 macht außerdem ersichtlich, dass Smad 2 sowohl in der Abfolge des TGF- β Signalwegs als auch in der des Activin-Signalwegs phosphoryliert wird, Smad 3 hingegen einzig durch TGF- β (33), was zu einem Verlust der Bande bei den entsprechenden Knockout Tieren führte. (71)

Es existieren viele Wechselwirkungen des TGF- β -Signalwegs mit anderen Enzymen, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und weiteren, nicht-Smad-vermittelten

Signalwegen. Neurotrophe Faktoren wie GDNF, FGF-2, BDNF, CNTF, NT-3/-4 und NGF sind auf den TGF- β Signalweg angewiesen, um ihre Wirkung zu verstärken, wenn nicht gar gänzlich zu entfalten. (25,64) Ein Verlust des TGF- β Signalwegs durch konditionellen Knockout des TGF- β -R2 führt demnach zu verminderter Wirkung neuroprotektiver Faktoren im Nervensystem, also verminderter Proliferation, Differenzierung und vermindertem Überleben von Neuronen. NGF beispielsweise ist, wie auch TGF- β , beteiligt an der frühen Phase Programmierter Zelltods, welcher während der Embryonalentwicklung in der Retina abläuft, um einsproßenden Axonen der Ganglienzellen Platz für die Bildung des N. opticus zu schaffen. (50) Neben den beschriebenen synergistischen Effekten von TGF- β und neurotrophen Faktoren wurde beschrieben, dass TGF- β das Aussprossen von Neuriten und das Längenwachstum von Axonen direkt fördert und somit möglicherweise eine Rolle spielt in der Bildung neuritischer Netzwerke im ZNS. (72) Dies wird besonders interessant durch die Erkenntnis, dass afferente gleichwohl wie efferente Verbindungen für das Überleben von Neuronen unabdingbar sind – inadäquate synaptische Kontakte und fehlende Vernetzung mit Nachbarzellen führen möglicherweise zur Apoptose. (73,74) Fehlende TGF- β Signalwirkung unter retinalen Neuronen durch konditionellen Knockout von TGF- β -R2 hieße in der Folge vermehrte Apoptose innerhalb der Retina. Durch die Existenz alternativer, Smad-unabhängiger Signalwege, zum Beispiel über die GTPase Ras oder MAPKs wie ERKs, p38 und JNKs (75), wird eine Beeinflussung der TGF- β Signalwirkung sowohl in positiver als auch negativer Richtung möglich (35,36). Da TGF- β immer zelltypspezifisch seine Wirkung entfaltet (75), kann es daher sein, dass es in einem Zelltyp zu einer Up-Regulation und in einem anderen zu einer Down-Regulation kommt.

Transgene α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Mäuse zeigen keinen morphologischen Phänotyp, wie es zum Beispiel von TGF- β -3^{fl/fl}- und TGF- β -2^{fl/fl}TGF- β -3^{fl/fl} Mäusen bekannt ist (49). Zu keinem der Zeitpunkte E12.5, E14.5 und E16.5 traten morphologische Unterschiede zu TGF- β -R2^{+/+} Mäusen auf. Dickenmessungen der Retina am Embryonaltag E16.5 ergaben an keiner Stelle der Retina einen signifikanten Unterschied zwischen transgenem Tier und Wildtyp, wenn auch eine Tendenz zu gering niedrigeren Retinadicken der α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere im Vergleich zu TGF- β -

R2^{+/+} Mäusen zu erkennen waren. Dies kann bereits auf ein vermehrtes apoptotisches Geschehen unter Verlust des TGF- β -Signalwegs in der Retina hinweisen.

Die Zellzählung von Vorläuferzellen innerhalb der Ventrikulär- und Marginalzone der embryonalen Retina zeigte weder zentral noch peripher statistisch signifikante Unterschiede.

Der Programmierte Zelltod in der embryonalen Retina wurde mittels TUNEL-Analysen visualisiert. Die Retina von Mäusen mit konditionellem Knockout von TGF- β -R2 weist einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate am Embryonaltag E12.5, E14.5 und E16.5 (in abfallender Tendenz) auf. Die detektierten apoptotischen Zellen zeigen sich dabei nicht auf einzelne retinale Schichten oder Bereiche begrenzt, wie es zu späteren Zeitpunkten im ontogenetischen Zelltod festgestellt wurde (71). Ein Gradient von zentral nach peripher (76) ist nicht erkenntlich.

Um zu untersuchen, ob und welche Auswirkungen der TGF- β -Signalweg auf die Proliferation von retinalen Zellen hat und auch zu erklären, warum trotz gesteigerter Apoptose die Dicke und Zellzahl der Retina nicht verringert ist, wurde die Zellproliferationsrate mittels BrdU-Färbung exemplarisch am Embryonaltag E16.5 bei α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} Versuchstieren verglichen. Obwohl TGF- β in manchen Systemen als Inhibitor der Zellproliferation beschrieben wird (77,78), ergaben sich keine signifikanten, quantitativen Diskrepanzen in der Proliferationsrate. Programmierter Zelltod wird allgemein, genauso wie die Synapsenbildung, als relativ spätes Ereignis in der neuronalen Entwicklung angesehen. (42) Zum Großteil erstreckt sich die Apoptose retinaler Zellen bei der Maus von der Geburt (d0) bis zum 18. Lebenstag (d18). Die insgesamt höchste Anzahl apoptotischer Ganglien-, Bipolar-, Müller- und Amakriner Zellen findet man an d8 (73), insgesamt unterliegen ca. 47% der Amakrinen-, Ganglien-, Bipolar- und Müllerzellen innerhalb dieser Zeit dem ontogenetischen Zelltod (73). Während der normalen Embryonalentwicklung findet man eine weniger ausgeprägte Phase Programmierten Zelltods, die nach Beschreibung in der Literatur am Embryonaltag E13.5 startet und zwischen E15.5 und E17.5 zum Höhepunkt kommt (76). Aus den Untersuchungen vorliegender Arbeit sind bereits zu einem früheren Zeitpunkt, mindestens ab Embryonaltag E12.5,

bemerkbare apoptotische Vorgänge zu verzeichnen, die sich durch die TUNEL-Analysen visualisieren ließen.

IV.2. Konditioneller Knockout von Smad 7

Neben Untersuchungen unter konditionellem Knockout des TGF- β -R2 wurden in vorliegender Arbeit Analysen unter konditionellem Knockout von Smad 7 durchgeführt und dessen Auswirkung auf den Programmierten Zelltod in der Retina von Mäuseembryonen herausgearbeitet. Da Smad 7 inhibitorisch auf den TGF- β Signalweg wirkt (33), somit unter konditionellem Knockout der TGF- β Signalweg verstärkt wird, wurden gegensätzliche Ergebnisse hinsichtlich apoptotischer Vorgänge erwartet. Dies konnte in TUNEL-Analysen zum Zeitpunkt E16.5 bestätigt werden; es ergaben sich signifikant geringe Apoptoseraten für α -Cre;Smad7^{fl/fl} Tiere im Vergleich zu ihren Wildtypen. Die Fähigkeit der Neurone zur Synapsenbildung und Vernetzung mit Nachbarzellen ist möglicherweise unter vermehrter Signalwirkung von TGF- β verstärkt, ebenso wie die, durch TGF- β 1 und 2 vermittelte, Aussprossung von Neuriten und das Längenwachstum von Axonen begünstigt ist. (72,74) Da fehlende synaptische Kontakte und inadäquate Vernetzung von Neuronen möglicherweise zu deren Absterben führen (73), ist die Begünstigung dieser Vorgänge eine Erklärung für das verminderte Auftreten Programmierten Zelltods unter konditionellem Knockout von Smad 7. Zusätzlich wird der antiapoptotische Effekt durch die Verstärkung neuroprotektiver Faktoren, wie NGF, NT-3 oder CNTF, die im Synergismus mit TGF- β wirken und für Differenzierung und Überleben von Neuronen verantwortlich sind, validiert. (25,64)

Eine Übernahme oder teilweisen Ersatz der Funktion von Smad 7 durch sein strukturell eng verwandtes Protein Smad 6 war nicht zu erwarten, da Smad 6, im Gegensatz zu Smad 7, welches sowohl hemmend in den BMP- als auch den TGF- β Signalweg eingreift, selektiv den BMP Signalweg inhibiert. (33) Smad 6 und 7 unterscheiden sich strukturell zwar stark von ihren übrigen Smad Subfamilien (R- und Co-Smads) (33), untereinander besteht aber eine hohe Strukturhomologie, was in Western-Blot Analysen durch die Kreuzaktivität des Primärantikörpers sichtbar wird. (71)

Auswirkungen des Knockouts auf die Morphologie des embryonalen Auges am Embryonaltag E16.5 wurden im Vergleich zu Wildtypen nicht detektiert.

IV.3. Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Das Forschungsfeld von TGF- β im Bereich der Medizin ist so weitreichend wie seine Eigenschaften selbst. TGF- β als multifunktionelles Zytokin, das Funktionen in unterschiedlichsten Bereichen und Vorgängen des Organismus, wie der Apoptose, der Proliferation, der Morphogenese, der Zelldifferenzierung, des Gewebeumbaus, der Embryonalentwicklung, der Zellwanderung, der Hämatopoese, der Angiogenese, der Chemotaxis und innerhalb des Immunsystems übernimmt (25,26), spielt nicht nur im Bereich des Auges bei Erkrankungen wie der Proliferativen Vitreoretinopathie, der diabetischen Retinopathie oder dem Offenwinkelglaukom eine Rolle (79), sondern zum Beispiel auch im Rahmen kardialer Erkrankungen (80) und nicht zuletzt bei der Entstehung von Tumoren (33,34,81,82). TGF- β spielt somit als mögliches Ziel in der Therapie von Erkrankungen eine bedeutende Rolle. So konnten in der Therapie von degenerativen retinalen Erkrankungen wie der Retinopathia pigmentosa bereits Behandlungen unter Zugabe neurotropher Faktoren durchgeführt werden, welche den Krankheitsfortschritt verzögerten. (10,14) Da neuroprotektive Faktoren auf den TGF- β Signalweg angewiesen sind, um ihre Wirkung zu verstärken, wenn nicht gar gänzlich zu entfalten (25,64), ist es von besonderem Interesse das Zusammenwirken dieser beiden Komponenten weitergehend zu erforschen, um degenerative neuronale Erkrankungen eines Tages in ihrem Fortschreiten stoppen zu können.

Die Frage danach, ob der TGF- β -Signalweg antiapoptotische (51,83,84) oder proapoptotische (25,26,49,50,65,85) Wirkung zeigt, bleibt in der Literatur kontrovers. Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass es unter Abwesenheit der TGF- β Signalwirkung in retinalen Neuronen zu vermehrtem Programmierter Zelltod während der Embryonalentwicklung kommt und korrelierende Ergebnisse für den ontogenetischen Zelltod vorliegen (71), werden nachfolgende Versuche zum Ziel haben etwaige strukturelle sowie funktionelle Veränderungen der Netzhaut bei adulten Mäusen festzustellen. So ist es interessant

herauszufinden, ob es im Bereich der Retina zu Funktionseinschränkungen beziehungsweise –ausfällen kommt – ob zum Beispiel das Sehvermögen der Mäuse eingeschränkt ist. Es werden Zählungen der Axone des N. opticus durchgeführt werden, um dort möglicherweise Veränderungen im Vergleich zu Wildtypen festzustellen. Außerdem soll mit Hilfe von Lichtschadensmodellen untersucht werden, ob bei TGF- β -R2 Knockouts eine Veränderung der Reparaturfähigkeit und der Verletzlichkeit der Netzhaut vorliegt.

Parallel dazu werden auch Smad 7 Knockout Modelle wieder in den Fokus der Investigation treten, um den möglicherweise neuroprotektiven Charakter innerhalb der Netzhaut, der durch eine verstärkte TGF- β Signalwirkung zustande kommt, bestätigen zu können. Dazu werden ebenfalls Axonzählungen durchgeführt sowie Lichtschadensmodelle verwendet werden.

In zellkulturellen Versuchen wird die direkte antiapoptotische Wirkung von TGF- β 2 auf Neurone untersucht werden.

V. Zusammenfassung

Den Einfluss des TGF- β Signalwegs auf den Programmierten Zelltod in der Retina während der Embryonalentwicklung zu untersuchen, war Gegenstand vorliegender Arbeit. Durch konditionellen Knockout des TGF- β -Rezeptors2 wurden die Voraussetzungen dafür geschaffen. In TUNEL-Analysen konnte unter Blockade des TGF- β Signalwegs eine signifikant höhere Apoptoserate am Embryonaltag E12.5, E14.5 und E16.5 in der Retina festgestellt werden, was folgern lässt, dass TGF- β antiapoptotische Wirkung auf retinale Neurone hat. Durch BrdU-Färbungen, Zellzählungen und Dickenmessungen der Retina ließ sich eine Veränderung der Proliferationsrate ausschließen und schlussfolgern, dass der fehlende offensichtliche Phänotyp durch sehr geringe numerische Werte der apoptotischen Zellen zustande kommt. Lediglich eine Tendenz zu geringeren Retinadicken der transgenen Tiere konnte detektiert werden.

Um die Ergebnisse unter konditionellem Knockout des TGF- β -Rezeptors2 zu bestätigen, wurde eine zweite Mauslinie unter konditionellem Knockout von Smad 7 herangezogen. Auch in diesem Fall ergab die Phänotypanalyse der α -Cre;Smad7^{fl/fl} Mäuse keine Unterschiede zu Smad7^{+/+} Mäusen. Die Untersuchungen mittels TUNEL-Analysen am Embryonaltag E16.5 ergaben eine signifikante Reduzierung der retinalen Apoptose unter Verstärkung des TGF- β Signalwegs durch fehlendes negatives Feedback von Smad 7 und bestätigten die Annahme, dass TGF- β während der Embryonalentwicklung antiapoptotisch auf die Neurone der Retina wirkt.

VI. Anhang

VI.1. Literaturverzeichnis

1. Eisler R. Philosophen-lexikon: Leben, Werke und Lehren der Denker. E. S. Mittler und Sohn; 1912.
2. Welsch U. Sobotta Lehrbuch Histologie Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2. Aufl., 2. Nachdr. München [u.a.]: Urban & Fischer in Elsevier; 2009.
3. Universität Düsseldorf. Sehorgan [Internet]. 2012 [zitiert 2011 Dez 15]. http://www.uni-duesseldorf.de/MedFak/mai/teaching/content/neuroanatomie/kapitel_20.php
4. Ulfing N. Kurzlehrbuch Neuroanatomie : 50 Tabellen. Stuttgart ;New York NY: Thieme; 2008.
5. Schünke M. Prometheus Lernatlas der Anatomie. Stuttgart: Georg Thieme; 2006.
6. Klinke R. Physiologie. 5., komplett überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2005.
7. Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11., komplett überarb. und erg. Aufl. Stuttgart ;New York: Thieme; 2002.
8. Fini M. Vertebrate eye development. Berlin ;New York: Springer-Verlag; 2000.
9. Spitznas M. Zur Feinstruktur der sog. Membrana limitans externa der menschlichen Retina. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 1970;180(1):44–56.
10. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. The Lancet. 2006;368(9549):1795–809.
11. Cvekl A, Tamm ER. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. Bioessays. 2004 Apr;26(4):374–86.
12. Grehn F. Augenheilkunde mit 20 Tabellen. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.; 2008.
13. Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ, van Veen T, Zrenner E, u. a. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. Mol. Neurobiol. 2008 Dez;38(3):253–69.

14. Shintani K, Shechtman DL, Gurwood AS. Review and update: current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry*. 2009 Juli;80(7):384–401.
15. Moore K. Embryologie : Entwicklungsstadien : Frühentwicklung Organogenese Klinik. 5. Aufl. München [u.a.]: Elsevier Urban & Fischer; 2007.
16. Barishak Y. Embryology of the eye and its adnexae. Basel ; New York: Karger; 1992.
17. Sadler T. Medizinische Embryologie : die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 11., aktualisierte u. erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2008.
18. Drews U. Taschenatlas der Embryologie. 2., unveränd. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2006.
19. Schulze S. Kurzlehrbuch Embryologie : Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog mit 18 Tabellen. 1. Aufl., [Nachdr.]. München: Elsevier Urban & Fischer; 2009.
20. Ulfing N. Kurzlehrbuch Embryologie : 9 Tabellen. 2., überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2009.
21. Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(2):589.
22. Smith RS, Zabaleta A, Savinova OV, John SW. The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death. *BMC Dev. Biol*. 2001;1:3.
23. Remé C, d' Epinay SL. Periods of development of the normal human chamber angle. *Doc Ophthalmol*. 1981 Juli 15;51(3):241–68.
24. Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F, Gruss P. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell*. 2001;105(1):43–55.
25. Krieglstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J. Physiol. Paris*. 2002 März;96(1-2):25–30.
26. Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF-beta mediated apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 2002 Jan;307(1):1–14.
27. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, u. a. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J*. 1988 Dez 1;7(12):3737–43.
28. Ohta M, Greenberger JS, Anklesaria P, Bassols A, Massagué J. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic

- progenitor cells. *Nature*. 1987 Okt 8;329(6139):539–41.
29. Madisen L, Webb NR, Rose TM, Marquardt H, Ikeda T, Twardzik D, u. a. Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA*. 1988 Feb;7(1):1–8.
 30. Jakowlew SB, Dillard PJ, Sporn MB, Roberts AB. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol. Endocrinol*. 1988 Dez;2(12):1186–95.
 31. Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM, Fields A, Roberts AB, Sporn MB, u. a. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem*. 1990 Jan 15;265(2):1089–93.
 32. Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. The Transforming Growth Factor-betas: Structure, Signaling, and Roles in Nervous System Development and Functions. *Journal of neurochemistry*. 2000;75(6):2227–40.
 33. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem*. 1998;67:753–91.
 34. Attisano L, Wrana JL. Signal Transduction by the TGF-beta Superfamily. *Science*. 2002;296(5573):1646.
 35. Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2008;40(3):383–408.
 36. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007 Apr;19(2):176–84.
 37. Grimm S. Die Apoptose: Programmierter Zelltod. *Chemie in unserer Zeit*. 2003 Juni 1;37(3):172–8.
 38. Glücksmann A. Cell Deaths in Normal Vertebrate Ontogeny. *Biological Reviews*. 1951 Feb 1;26(1):59–86.
 39. Saunders JW Jr. Death in embryonic systems. *Science*. 1966 Nov 4;154(3749):604–12.
 40. Geelen JA, Langman J. Closure of the neural tube in the cephalic region of the mouse embryo. *Anat. Rec*. 1977 Dez;189(4):625–40.
 41. Homma S, Yaginuma H, Oppenheim RW. Programmed cell death during the earliest stages of spinal cord development in the chick embryo: a possible means of early phenotypic selection. *J. Comp. Neurol*. 1994 Juli 15;345(3):377–95.
 42. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci*. 1991;14:453–501.

43. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 1972 Aug;26(4):239–57.
44. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):653–60.
45. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):641–52.
46. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet. Pathol*. 2003 Sep;40(5):481–95.
47. Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, u. a. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 2002 März;84(2-3):215–22.
48. Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T, Yamanaka I, Oshima Y, Hata Y, u. a. Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. *Am. J. Pathol*. 2001 Apr;158(4):1271–8.
49. Dünker N, Krieglstein K. Reduced programmed cell death in the retina and defects in lens and cornea of *Tgfb2*^{–/–}*Tgfb3*^{–/–} double-deficient mice. *Cell and Tissue Research*. 2003 Juli;313(1):1–10.
50. Dünker N, Schuster N, Krieglstein K. TGF- β modulates programmed cell death in the retina of the developing chick embryo. *Development*. 2001;128(11):1933.
51. Walshe TE, Saint-Geniez M, Maharaj ASR, Sekiyama E, Maldonado AE, D'Amore PA. TGF- β Is Required for Vascular Barrier Function, Endothelial Survival and Homeostasis of the Adult Microvasculature. Eickelberg O, Herausgeber. *PLoS ONE*. 2009 Apr;4(4):e5149.
52. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol*. 1996 Okt 10;179(1):297–302.
53. Lukowski R, Weber S, Weinmeister P, Feil S, Feil R. Cre-loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspektrum*. 2005;11(3):287–90.
54. Rossant J, McMahon A. „Cre“-ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev*. 1999 Jan 15;13(2):142–5.
55. Nagy A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *genesis*. 2000 Feb 1;26(2):99–109.

56. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988 Juli 1;85(14):5166–5170.
57. Kühn R, Torres RM. Cre/ loxP Recombination System and Gene Targeting. *Transgenesis Techniques* [Internet]. New Jersey: Humana Press; [zitiert 2011 Nov 21]. p. 175–204. <https://ssllgate.uni-regensburg.de/content/j662160h054712qj/DanaInfo=www.springerlink.com,SSO=U+#section=89732&page=1>
58. Walther C, Gruss P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*. 1991 Dez;113(4):1435–49.
59. Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science*. 1995 Sep 8;269(5229):1427–9.
60. Kos CH. Cre/loxP System for Generating Tissue-specific Knockout Mouse Models. *Nutrition reviews*. 2004;62(6):243–6.
61. Chytil A, Magnuson MA, Wright CVE, Moses HL. Conditional inactivation of the TGF-beta type II receptor using Cre:Lox. *Genesis*. 2002 Feb;32(2):73–5.
62. Kleiter I, Pedré X, Mueller AM, Poeschl P, Couillard-Despres S, Spruss T, u. a. Inhibition of Smad7, a negative regulator of TGF-beta signaling, suppresses autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol*. 2007 Juli;187(1-2):61–73.
63. Krieglstein K, Richter S, Farkas L, Schuster N, Dünker N, Oppenheim RW, u. a. Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death. *Nat. Neurosci*. 2000 Nov;3(11):1085–90.
64. Krieglstein K, Farkas L, Unsicker K. TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *J. Neurobiol*. 1998 Dez;37(4):563–72.
65. Beier M, Franke A, Paunel-Gorgulu AN, Scheerer N, Dünker N. Transforming growth factor beta mediates apoptosis in the ganglion cell layer during all programmed cell death periods of the developing murine retina. *Neuroscience research*. 2006;56(2):193–203.
66. Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*. 1991 Aug 11;19(15):4293.
67. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, u. a. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487–91.
68. Vosberg HP. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum. Genet*. 1989 Aug;83(1):1–15.

69. Richardson KC, Jarett L, Finke EH. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 1960 Nov;35:313–23.
70. Promega. DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System [Internet]. [zitiert 2011 Aug 25]. <http://www.promega.com/products/cell-health/apoptosis/tunel-assays/deadend-colorimetric-tunel-system/>
71. Pielmeier, Stefan. Der Einfluss des TGF-beta Signalwegs auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina [Diss.]. [Regensburg]: Universität Regensburg; 2012.
72. Ishihara A, Saito H, Abe K. Transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 promote neurite sprouting and elongation of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1994 März 7;639(1):21–5.
73. Young RW. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 1984 Nov 1;229(3):362–73.
74. Rager G, Rager U. Systems-matching by degeneration. I. A quantitative electron microscopic study of the generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. *Exp Brain Res.* 1978 Sep 15;33(1):65–78.
75. Moustakas A, Heldin C-H. Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell. Sci.* 2005 Aug 15;118(Pt 16):3573–84.
76. Frade JM, Barde YA. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development.* 1999 Feb;126(4):683–90.
77. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur. Cytokine Netw.* 1996 Sep;7(3):363–74.
78. Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. *Cell regulation.* 1990;1(12):875.
79. Saika S. TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab. Invest.* 2006 Feb;86(2):106–15.
80. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 2007 Mai 1;74(2):184–95.
81. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, u. a. Transforming Growth Factor-β1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell.* 2001 Jan 1;12(1):27 –36.
82. Itoh S, Itoh F, Goumans M, ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-β family members through Smad proteins. *European Journal of Biochemistry.* 2000 Dez 15;267(24):6954–67.
83. Lei X, Yang J, Nichols RW, Sun L-Z. Abrogation of TGFbeta signaling induces

- apoptosis through the modulation of MAP kinase pathways in breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 2007 Mai 1;313(8):1687–95.
84. Lei X, Wang L, Yang J, Sun L-Z. TGFbeta signaling supports survival and metastasis of endometrial cancer cells. *Cancer Manag Res.* 2009 Apr;2009(1):15–24.
85. Schuster N, Dünker N, Krieglstein K. Transforming growth factor-beta induced cell death in the developing chick retina is mediated via activation of c-jun N-terminal kinase and downregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-X(L). *Neurosci. Lett.* 2002 Sep 27;330(3):239–42.

VI.2. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ÜBERSICHT ÜBER DEN DREISCHICHTIGEN WANDAUFBAU DES AUGES	1
ABBILDUNG 2: SCHICHTUNG DER RETINA	4
ABBILDUNG 3: URSPRUNGSGEWEBE DER AUGENANLAGE/ ABSTAMMUNG AUS DEN DREI KEIMBLÄTTERN	10
ABBILDUNG 4: TGF- β SIGNALWEG	17
ABBILDUNG 5: WESTERN BLOT ANALYSE VON TGF- β -R2(A) BZW. PSMAD 2/3 (B) ZUM NACHWEIS DES KONDITIONELLEN KNOCKOUTS VON TGF- β -R2	42
ABBILDUNG 6: PHÄNOTYP α -CRE;TGF- β -R2 ^{FL/FL}	44
ABBILDUNG 7: RETINADICKENMESSUNGEN ZUM ZEITPUNKT E16.5 BEI α -CRE;TGF- β -R2 ^{FL/FL} UND TGF- β -R2 ^{+/+}	46
ABBILDUNG 8: ZELLZÄHLUNG DER RETINA ZUM ZEITPUNKT E16.5 BEI α -CRE;TGF- β -R2 ^{FL/FL} UND TGF- β -R2 ^{+/+}	47
ABBILDUNG 9: TUNEL-REAKTION BEI α -CRE;TGF- β -R2 ^{-/-} UND TGF- β -R2 ^{+/+}	48
ABBILDUNG 10: RELATIVE ANZAHL TUNEL-POSITIVER ZELLEN BEZOGEN AUF MM ² RETINA BEI KONDITIONELLEM KNOCKOUT VON TGF- β -R2 AM EMBRYONALTAG E12.5, E14.5 UND E16.5	49
ABBILDUNG 11: BRDU-FÄRBUNG BEI KONDITIONELLEM KNOCKOUT VON TGF- β -R2	50
ABBILDUNG 12: BRDU-POSITIVE ZELLEN BEZOGEN AUF MM ² RETINA BEI WILDTYPE UND TRANSGENEM TIER AM EMBRYONALTAG 16.5	51
ABBILDUNG 13: WESTERN BLOT ANALYSE VON SMAD 6 UND SMAD 7 ZUM NACHWEIS DES KONDITIONELLEN KNOCKOUTS VON SMAD 7	52
ABBILDUNG 14: PHÄNOTYP α -CRE;SMAD7 ^{FL/FL}	52
ABBILDUNG 15: TUNEL-REAKTION BEI KONDITIONELLEM KNOCKOUT VON SMAD 7	53
ABBILDUNG 16: RELATIVE ANZAHL TUNEL-POSITIVER ZELLEN BEZOGEN AUF MM ² RETINA BEI KONDITIONELLEM KNOCKOUT VON SMAD 7 AM EMBRYONALTAG E16.5	54

VI.3. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: REAGENZIELISTE	24
TABELLE 2: ENZYME.....	25
TABELLE 3: KITS	25
TABELLE 4: VERBRAUCHSMATERIALIEN	25
TABELLE 5: GERÄTE.....	26
TABELLE 6: PUFFER UND LÖSUNGEN	28
TABELLE 7: PRIMÄRANTIKÖRPER	28
TABELLE 8: SEKUNDÄRANTIKÖRPER	28
TABELLE 9: GENOTYPISIERUNGSPRIMER	29
TABELLE 10: MASTERMIX CRE-PCR FÜR EINEN ANSATZ	31
TABELLE 11: PCR-PROGRAMM CRE	32
TABELLE 12: MASTERMIX TGF- β -R2 PCR FÜR EINEN ANSATZ	33
TABELLE 13: PCR-PROGRAMM TGF- β -R2	33
TABELLE 14: MASTERMIX SMAD7 PCR FÜR EINEN ANSATZ	34
TABELLE 15: PCR-PROGRAMM SMAD7	34
TABELLE 16: EINBETTPROGRAMM PARAFFIN	35
TABELLE 17: ENTWÄSSERUNG ZUR EPONEINBETTUNG	37
TABELLE 18: EPONEINBETTUNG	37
TABELLE 19: ABFOLGE DER ENTPARAFFINIERUNG	38
TABELLE 20: TUNEL-REAKTION	39
TABELLE 21: BRDU-FÄRBUNG	40

VI.4. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ad lib.	„ad libitum“ nach Belieben
AIF	apoptosis-inducing factor
AK	Antikörper
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	brain-derived neurotropic factor
Bid	BH3 interacting domain death agonist
bidest.	Bidestillatus
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
ca.	Circa
c-MAF	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
CNTF	ciliary neurotrophic factor
Co-Smad	collaborating Smad
Cre	cyclization recombination
d	“day” Tag, destillatus
d.h.	das heißt
Da	Dalton
Dab2	disabled-2
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpt	Dioptrien (m^{-1})
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
E	Embryonaltag, Extinktion

Ebaf	Endometrial bleeding associated factor
Erk	extracellular signal-regulated kinase
FGF	„fibroblast growth factor“ Fibroblastenwachstumsfaktor
fl/fl	flox/ flox
FOX	Forkhead box protein
fwd	vorwärts (Primer)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	growth differentiation factor
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP	green fluorescent protein
GS	Glycin und Serin
GZL	„ganglion cell layer“ Ganglienzellschicht
H ₂ O	Wasser
IAP	inhibitor of apoptosis
INL	„inner nuclear layer“ innere Körnerschicht
I-Smad	inhibitory Smad
JNK	Jun N-terminale Kinase
k	Kilo (10 ³)
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
loxP	locus of crossover (x) in P1 bacteriophage
M	molar, „musculus“ Muskel
m	milli (10 ⁻³), Meter

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MH	mad homology
min	Minute
mm	Mus musculus
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	nano (10 ⁻⁹)
N	Teilchenzahl
N.	„nervus“ Nerv
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NGF	nerve growth factor
NT-3/-4	Neurotrophin-3/-4
ONL	„outer nuclear layer“ äußere Körnerschicht
OS	Ora serrata
PAK2	p21-activated kinase 2
Pax	paired box
PBS	„phosphate buffered saline“ phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“ Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PITX	Pituitary homeobox
pos.	Positiv
R	Rezeptor
rev	rückwärts (Primer)
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	„revolutions per minute“ Umdrehungen pro Minute
R-Smad	receptor-regulated Smad

rTdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SARA	Smad anchor for receptor activation
SEM	„standard error of the mean“ Standardfehler
Shh	Sonic Hedgehog
Smad	Sma- and Mad-related Protein
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factors
SSC	Standard Saline Citrate
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF	„tumor necrosis factor“ Tumornekrosefaktor
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- Salzsäure
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
W	Watt
w/v	“weight per volume” Gewicht pro Volumen
Wdh.	Wiederholungen

VI.5. Symbolverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
∞	unendlich
α	anti, alpha
β	beta

VI.6. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Leuten herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Ernst R. Tamm für die Vergabe dieses Dissertationsthemas, das mir als Studentin die Möglichkeit gab einen „Blick über den Tellerrand zu werfen“ und mein Forschungsfeld über die Zahnmedizin hinaus zu erweitern, seine Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Herbert Jägle möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Barbara M. Braunger für die fachlich einwandfreie und stets herzliche Betreuung, ihren Ideenreichtum und ihre Hilfsbereitschaft - auch außerhalb des Labors.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie, insbesondere Frau Elke Stauber, Silvia Babl, Margit Schimmel und Angelika Pach, für ihre Unterstützung und für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit bedanken.

Dank an Herrn Dr. Stefan Pielmeier für die ausführliche Einarbeitung in die Laborabläufe und viele wertvolle Tipps und Erkenntnisse.

Herrn Dr. Andreas Neueder danke ich für seine Hilfsbereitschaft, vor allem in technischer Hinsicht.

Bei Frau Victoria Landstorfer bedanke ich mich für gute Zusammenarbeit im Labor, kollegiale Unterhaltungen und vieles mehr.

Ebenso danke ich Herrn Jörn Burghaus für die Teilhabe an seinem Erfahrungsschatz hinsichtlich der Erstellung wissenschaftlicher Arbeiten und für Ablenkungen außerhalb des Labors.

Meinen Eltern danke ich an dieser Stelle für Ihre grenzenlose Unterstützung in jeglicher Hinsicht, nicht nur während der Promotion sondern während meines gesamten Studiums in Regensburg.

VI.7. Lebenslauf

	<u>Persönliche Daten</u>
Geburtsdatum	Cora Demmer
Geburtsort	14.06.1986
Familienstand	Meerbusch
	ledig
	<u>Bildungsweg</u>
2009 - 2012	Promotion am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie des Instituts für Anatomie, Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm, Universität Regensburg „Programmierter Zelltod in der Retina von α -Cre;TGF- β -R2 ^{fl/fl} und α -Cre;Smad7 ^{fl/fl} Mäusen während ihrer Embryonalentwicklung“
Juli 2011	Erhalt der Approbation, München
Juni 2011	Staatsexamen, Universität Regensburg
Oktober 2008	Zahnärztliche Vorprüfung, Universität Regensburg
April 2007	Naturwissenschaftliche Vorprüfung, Universität Regensburg
2006 – 2011	Studium der Zahnmedizin, Universität Regensburg
Juni 2005	Allgemeine Hochschulreife, Städt. Gymnasium Neuss/ Norf
1996 - 2005	Städt. Gymnasium Neuss/ Norf, Neuss
1992 - 1996	St. Andreas Grundschule, Neuss
	<u>Anstellungen</u>
seit Januar 2012	Assistenzzeit, Nürnberg

VI.8. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Nürnberg, den 16.05.2013

Cora Demmer